

Impl. 23.6.93

23.6.93

WILLIAM SAHADE

Cirurgião Dentista

ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE TECIDO NER-  
VOSO EM SUSPENSÃO EM SÔRO SANGUÍNEO  
DE «*Sus scrofa domesticus*, Gray»: - INVESTIGAÇÃO  
SÔBRE FATOR CONTROLADOR.

Tese apresentada à Faculdade de Odon-  
tologia de Piracicaba da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção  
do grau de Doutor em Ciências  
(Bioquímica).

PIRACICABA - S. P.  
1970

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais

A minha Espôsa e filhos

A meus irmãos

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. ZEFERINO VAZ, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, cujo exemplo estimula e dignifica o trabalho na Universidade.

Ao Prof. Dr. PLÍNIO ALVES DE MORAES, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, e Professor de Microbiologia desta Faculdade, nossa gratidão pelo estímulo constantemente demonstrado.

Ao Prof. Dr. Geraldo Claret de Mello Ayres, Professor de Bioquímica e Fisiologia desta Faculdade, pelo incentivo, orientação e confiança em nós depositados.

Ao Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE ROBERTSON LIBERALLI, Professor Emérito desta Casa de ensino e pesquisa, pelo grandioso incentivo ao desenvolvimento das ciências básicas em Odontologia.

(Aos Professores Doutores ANDRÉS JOSÉ TUMANG, Regente da Cadeira de Odontologia Preventiva e Saúde Pública desta Faculdade, e DÉCID BARBIN, Professor-Assistente Doutor da Cadeira de Matemática - da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela orientação na análise estatística desenvolvida.)

Ao Prof. Dr. EDUARDO DARUGE, Regente da Cadeira de Odontologia Legal desta Faculdade, que em momento algum deixou de agradecer-nos com esforços e estímulos inestimáveis.

Aos colegas e amigos, Cirurgiões Dentistas TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO e GUIDO MENEGATTO, pela colaboração e dedicação prestadas.

Ao Sr. MOACYR CORRÊA e Sra. DIRCE CAMPOS CRYSTAL, Técnicos de Laboratório, pela colaboração e atenção recebidas.

Ao Sr. IVES ANTONIO CORAZZA, responsável pela parte datilográfica, pela dedicação com que se houve.

Ao Acadêmico JOAQUIM ANTONIO PIRES NETO, pelo esmero na execução dos gráficos.

Ao Sr. SEBASTIÃO RODRIGUES DE BARROS e JOÃO WALDER RIZZI,  
executores dos **serviços** de impressão da tese.

Aos Colegas e Funcionários que colaboraram direta ou indi  
retamente na elaboração desta tese.

\*

\*

\*

# Í N D I C E

	P.
1 - INTRODUÇÃO .....	7
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
3 - MATERIAL E MÉTODO .....	13
4 - RESULTADOS .....	20
5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
6 - DISCUSSÃO .....	48
7 - CONCLUSÕES .....	61
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
9 - APÊNDICE .....	67

\*

\*

\*

## 1 - INTRODUÇÃO

A complexidade que envolve os estudos sobre a respiração celular, nos organismos pluricelulares, se deve a um grande número de variáveis interrelacionadas. Este fato dificulta a aplicabilidade genérica dos métodos de investigação, obrigando o investigador a estudar a célula e suas relações com o organismo, sempre em seus aspectos particulares e específicos.

A Ciência, à medida que se desenvolve, fornece as soluções dos problemas parciais em relação ao todo, cabendo às especulações - de ordem filosófico-científica a inteiração global dos resultados, para a melhor compreensão e explicação biológica do ser vivo.

Os problemas inerentes à investigação e esclarecimento sobre a respiração celular nos diferentes tecidos, estão entre os objetivos da bioquímica.

Conseqüentemente, uma contribuição ao estudo da influência dos meios de suspensão, na respiração de tecidos animais "in vitro", é justificável, ainda porque este aspecto carece de melhores informações, como se depreende da própria literatura específica.

No presente trabalho se propõe estudar o consumo de oxigênio "in vitro", por fatias de tecido nervoso (cérebro) de suino - ("Sus scrofa domesticus, Gray"), suspensas em soro sanguíneo integral e sob diferentes condições artificialmente estabelecidas.

O número de pesquisas nesse campo tem sido pequeno, principalmente em relação a soro sanguíneo como meio de suspensão.

Quanto à espécie animal que serviu de suporte biológico para as investigações, são poucos os conhecimentos disponíveis relacionados com o problema ora focalizado. Devem ser salientadas as maiores possibilidades que o mesmo oferece, no sentido da obtenção de soro em volumes suficientes para a aplicação dos diferentes tratamentos, pré-estabelecidos no planejamento da pesquisa.

Em trabalho sobre determinações de  $QO_2$  e  $QO_2^{(N)}$  em tecidos de suino, AYRES (1) verificou que diferentes tecidos, cérebro, músculo e polpa dental, respiraram melhor, ou mais eficientemente quando suspensos em solução tampão Krebs-Ringer-fosfato (39), se comparados àqueles suspensos em soro sanguíneo homólogo.

Na discussão do trabalho o autor sugeriu que, por apresentar o soro sanguíneo maiores quantidades de partículas em solução e/ou em suspensão, permitiria menores possibilidades de oxigenação - (dissolução física do oxigênio), que o sistema tampão Krebs-Ringer--

fosfato (39).

BACILA (\*), analisando os resultados obtidos por AYRES (1), sugeriu que sem desprezar o aspecto físico-químico do problema, haveria uma possibilidade bioquímica: no sôro talvez existisse um "fator" inibitório ou regulador da respiração dos tecidos que se manifestasse, mesmo "in vitro", como no caso presente.

Tentando esclarecer os aspectos físico e bioquímico do problema, foi planejada a presente pesquisa, de tal maneira que, caso existisse o "fator" regulador da respiração no sôro sanguíneo, possivelmente seria determinada sua natureza, segundo a seguinte classificação:

- a) se de natureza proteínica;
- b) se de natureza não proteínica e não iônica;
- c) se de natureza não proteínica, porém iônica;
- d) se de natureza catiônica ligada à proteínas;
- e) se de condicionamento exclusivamente físico.

Este esquema foi integralmente desenvolvido e constituiu-se no que se designou SÉRIE A, com resultados próprios e bem caracterizados.

Em consequência dos resultados obtidos na SÉRIE A, estabeleceu-se uma segunda etapa, SÉRIE B, para o prosseguimento da pesquisa, o que proporcionou novos resultados, complementares.

A diferença entre as duas séries consistiu numa variação - introduzida no meio de suspensão: diluição dos sôros tratados ou não, em solução tampão Krebs-Ringer-fosfato (39). Isto criou condições de avaliação da intensidade de alterações de comportamento metabólico do tecido nervoso (córtex cerebral), pelas variações físico-químicas introduzidas nos sôros sanguíneos.

Como suplementação para a avaliação dos resultados, pesquisou-se, finalmente, a influência da concentração de oxigênio atmosférico no comportamento de fatias de córtex cerebral suspensas em tampão Krebs-Ringer-fosfato (39).

\*

\*

\*

---

(\*) Observação pessoal - 1965

QUASTEL & WHEATLEY (32), em 1932, estudaram a oxidação por cérebro integral de cobaias, ratos e camundongos, utilizando manômetro de Barcroft. Observaram a oxidação de açúcares, de succinato e a influência de iodoacetato, em meio com pH igual a 7,40 e sob temperatura de 37°C.

HIMWICH & NAHUM (23), em 1932, estabeleceram o valor 1,00 para o quociente respiratório de tecido nervoso (cérebro) de cães. Determinaram também que 14 ml de oxigênio eram consumidos por 100 mg de cérebro, por minuto.

DIXON & MEYER (10), em 1936, trabalharam com homogenizado de cérebro de ratos e verificaram que frações de diferentes áreas do córtex apresentaram diferentes consumos de oxigênio em presença de glicose. Verificaram ser maior a atividade respiratória de córtex cerebral, que de outras porções do cérebro.

CANZANELLI e colaboradores (7), em 1939, trabalhando com diferentes tecidos de cobaias, determinaram os efeitos produzidos por alterações de pH, sobre o consumo de oxigênio "in vitro". Observaram que quando o meio se tornou mais alcalino, houve aumento no  $QO_2$  de cérebro, estando o pH ótimo entre 9,00 e 9,50. Nestes intervalos de pH, outros tecidos tornaram-se inativos (fígado, rins e testículos).

FIELD e colaboradores (16), em 1944, estudando o consumo de oxigênio por tecido cerebral de ratos adultos, verificaram que o  $QO_2$  foi constante por três horas nas temperaturas de 0,2°C a 37°C, diminuindo após esse tempo à temperatura de 40°C.

FUHRMAN & FIED (18), em 1944, verificaram a influência de baixas temperaturas, durante a preparação de fatias de tecido, nos estudos de respiração "in vitro". Ficou demonstrado que a temperatura do banho não altera o comportamento do tecido cerebral, desde que as variações fiquem dentro de limites fisiológicos.

WORTIS (42), em 1944, estudou o comportamento do tecido cerebral sob a influência do soro e ainda a reativação da oxidação cerebral. Observou que após um tempo de estabilização rápido, a adição de uma pequena quantidade de soro ao meio de suspensão, promove inibição. Trabalhou com homogenizado de cérebro de rato, em tampão Krebs-Ringer-fosfato pH 7,38 e solução similar com 200 mg de glicose por 100 ml.



ELLIOT & HENRY (14), em 1946, estudaram o metabolismo de cérebro de ratos, sob baixa tensão de oxigênio, usando o tampão Krebs Ringer-fosfato-glicose como meio de suspensão. Observaram que a redução da tensão de oxigênio, dentro de certos limites, não alterou o rendimento respiratório.

KREBS (25), em 1950, estudou os fatores que alteram a taxa de respiração de tecidos isolados, quando em diferentes meios de suspensão, baseados na composição do plasma sanguíneo. Observou uma relação a córtex cerebral, que o  $QO_2$  é mais elevado quando em meio de suspensão isento de cálcio, para todas as espécies animais estudadas.

MATSUMOTO (28), em 1952, determinou a influência de íons e de glicose sobre a atividade de córtex cerebral de coelhos, empregando a manometria de Warburg e tampão Krebs-Ringer-fosfato como meio de suspensão.

GEIGER e colaboradores (20), em 1954, com experimentos de perfusão, usando frações sanguíneas no sistema de suspensão, estudaram cérebro em relação ao consumo de glicose e velocidade de utilização. Verificaram que há perda de habilidade para o consumo de glicose. Explicaram o fato sugerindo a possibilidade da ausência de algum fator, componente do sangue total.

GALLAGHER e colaboradores (19), em 1956, observaram a ação estimulante do cálcio, na utilização de citrato, durante a oxidação de glicose, por mitocôndria de cérebro de ratos e por outros tecidos.

TAKAGAKI e colaboradores (36), em 1958, trabalharam com fatias de cérebro de cobaias em tampão Krebs-Ringer-fosfato pH 7,00, estudando o efeito de alguns inibidores do metabolismo.

VRBA & FOLBERG (40), em 1958, publicaram estudos sobre o metabolismo endógeno de fatias de córtex cerebral de cobaias. Usaram como meio de suspensão o tampão Krebs-Ringer-fosfato e empregaram a respirometria de Warburg.

D'ARCANGELO (8), em 1959, empregou o tratamento com estreptomicina e di-hidroestreptomicina no estudo do consumo de oxigênio - por homogenizado de cérebro de rato.

AYRES (1), em 1965, pesquisou a atividade respiratória de tecidos de suíno (masséter, cérebro e polpa dental), definida em termos de  $QO_2$  e  $QO_2^{(N)}$ , através da respirometria de Warburg, sendo o nitrogênio dos tecidos, dosado pelo método micro-Kjeldahl. Estudou - entre outros aspectos, as consequências das variações relativas à natureza do meio de suspensão (soro sanguíneo e tampão Krebs-Ringer- -

fosfato) e do teor de oxigênio das atmosferas dos sistemas (atmosfera ambiente e atmosfera contendo 50% de oxigênio).

Observou que:

- a - cérebro apresentou atividade respiratória maior que masséter e masséter maior que polpa dental.
- b - tampão Krebs-Ringer-fosfato, para pH 7,40, foi sempre melhor meio de suspensão comparado ao soro sanguíneo - homólogo.
- c - maior tensão parcial de oxigênio na atmosfera dos sistemas em Warburg favorecem a atividade de masséter e cérebro.
- d - as atividades dos tecidos não sofreram alterações por ação de metabolismo microbiano, até três horas de respirometria.
- e - finalmente, em sugestão conclusiva, fez referências à influência de fatores físico-químicos inerentes ao soro sanguíneo, como limitantes da atividade respiratória dos tecidos "in vitro".

DRAHOTA e colaboradores (12), em 1965, estudando fatias de cérebro de ratos jovens e adultos, verificaram que o aceto-acetato - determinou aumento do consumo de oxigênio, mais eficazmente em ratos jovens que em adultos.

THANGAMANI (38), em 1965, estudou córtex de cérebro de cobaias, verificando os efeitos da acetalamida e íons de cálcio, sobre a respiração.

MENDELSON e colaboradores (30), em 1965, estudaram o efeito do magnésio no metabolismo de cérebro isolado de ratos, não detectando interferências na ausência de magnésio.

DUCKET (13), em 1965, publicou trabalho onde discutiu o problema da difusão do oxigênio em microrganismos e em tecidos animal e vegetal. Cita que a difusão intra-celular é inferior à difusão na água.

DATZMANSKA e colaboradores (9), em 1966, determinaram o cálcio total e o cálcio livre em soro de porco. Os resultados indicaram um alto nível, tanto para cálcio livre (19% do cálcio total), como - para cálcio total.

SKOLNIK e colaboradores (35), em 1966, estudaram o consumo de oxigênio por fatias de córtex cerebral e outros tecidos de ratos, em condições de hipóxia. Determinaram que o consumo de oxigênio pelos tecidos estudados, é diretamente proporcional ao logaritmo do conteúdo de oxigênio na mistura de gases.

KOZAWA & NAITO (26), em 1966, estudaram o efeito do sódio, potássio e cálcio no metabolismo de fatias de córtex cerebral de rato, com e sem estimulação elétrica, verificando que a retirada de cálcio do meio aumenta a atividade, com aumento da produção de ácido láctico.

EUGÊNIA e colaboradores (15), em 1967, estudaram a influência do pH na respiração e glicólise de fatias de cérebro de ratos, verificando que a pH 7,40 a respiração foi mais intensa.

TAKAGAKI (37), em 1968, trabalhando com fatias de córtex cerebral de cobaias, verificou a influência do cálcio nos intermediários glicolíticos.

KADRU & ARIMATSU (24), em 1968, verificaram o comportamento de fatias de córtex cerebral suspensas em tampão Krebs-Ringer-fosfato isento de cálcio, evidenciando incremento da respiração sem aumento da formação de ácido láctico, o que ocorre com adição de excesso de potássio. Verificaram ainda que esse efeito é reversível e somente ocorre com glicose e piruvato, não ocorrendo com succinato.

MATSUMOTO e colaboradores (29), em 1968, trabalharam com fatias de córtex cerebral e observaram que o consumo de oxigênio do ar atmosférico é praticamente constante, mesmo variando o teor de fosfato. Ainda, observaram que as variações de pH são significantes, em ausência de fosfato, quando então o consumo de glicose foi diminuído, havendo menor produção de ácido láctico.

SAVOV (34), em 1968, determinou em soro sanguíneo de porcos, frações individuais de cálcio, fósforo e proteínas.

FRIEDEL & Kliche (17), em 1968, trabalharam com cães anestesiados e verificaram que a administração de EDTA resultava decréscimo do cálcio sérico e aumento da atividade muscular.

RODGERS e colaboradores (33), em 1969, estudaram o comportamento de fatias de córtex cerebral e de outros tecidos, em presença de nitrogênio, hélio e hidrogênio: discutiram a possibilidade de pequenas alterações na pressão parcial de oxigênio, alterarem o consumo de oxigênio.

\*

\*

\*

### 3 - MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 - MATERIAL

O tecido cerebral de suíno foi estudado em duas séries distintas. Essa divisão foi adotada, considerando-se um critério baseado nos meios de suspensão.

Na série A foram utilizados cinco animais e na série B - três; número de animais suficiente sob o ponto de vista estatístico.

##### 3.1.1 - Obtenção dos animais

Cuidou-se de obter sempre animais de aproximadamente dois anos de idade, abatidos por sangria, seguida de decepção da cabeça e remoção da pele. Em seguida as cabeças foram transportadas para o laboratório, onde as caixas craneanas foram abertas com auxílio de serra manual e retirados os hemisférios cerebrais.

Foram coletados volumes de sangue (sempre do respectivo animal), suficientes para obtenção do soro, que iria servir como meio de suspensão, conforme o esquema experimental (obtenção do soro homólogo).

##### 3.1.2 - Obtenção das fatias de tecido

As áreas centrais dos córtex parietais dos hemisférios cerebrais, foram sempre as utilizadas para a obtenção das fatias, de espessuras dentro dos limites indicados por AYRES (1) PAUL (31) e por meio de tesoura cirúrgica, AYRES (1).

O material foi mantido sempre mergulhado no soro respectivo (segundo o esquema experimental), sendo inclusive lavado no soro, com a finalidade de se eliminar o maior número possível de hemácias. As lavagens (três vezes) foram efetuadas por simples ressuspensão e decantação, vertendo-se o frasco, desprezando-se o sobrenadante.

A temperatura de 38,5°C, AYRES (1), foi mantida durante o processamento das fatias.

A quantidade de tecido (0,90 ml de massa úmida), foi medida em pequenas colheres de plástico perfuradas, para escoamento do líquido de lavagem (soro correspondente).

### 3.1.3 - Meios de suspensão

Básicamente, segundo o objetivo da pesquisa, o sêro sanguíneo foi utilizado como meio de suspensão, tendo sofrido alguns processamentos que receberam as seguintes denominações:

#### SÉRIE A

- I - Sêro homólogo
- II - Sêro heterólogo
- III - Sêro dialisado
- IV - Sêro oxalatado
- V - Sêro citratado
- VI - Sêro com EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético)
- VII - Sêro precipitado.

#### SÉRIE B

Na série B foram utilizados os mesmos meios de suspensão - da série A, porém diluídos em solução tampão Krebs-Ringer-fosfato, na proporção de 20% de sêro tratado e 80% de solução tampão, apresentada em UMBREIT e colaboradores (39). A solução tampão foi preparada - para pH 7,40, segundo AYRES (1).

Os sêros homólogos foram obtidos após coagulação do sangue seguido de centrifugação a 10.000 rpm, durante 5 minutos, sempre utilizando-se de sangue não hemolizado.

Os sêros heterólogos foram obtidos da mesma forma, sendo guardados em congelador a  $-5^{\circ}\text{C}$ . Os acondicionamentos dos sêros sanguíneos foram feitos em frascos plásticos.

### 3.1.4 - Preparação dos sêros modificados

3.1.4.1 - Preparação do sêro dialisado:- 50 ml de sêro integral foram acondicionados em sacos específicos para diálise, que se processou entre o sêro sanguíneo integral e tampão fosfato 0,001M pH 7,40, por 24 horas, com troca da solução tampão após 10 horas de diálise.

A diálise foi realizada à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , sob agitação mecânica. Após 24 horas foram medidos os volumes finais contidos nos

saquinhos de diálise, os quais atingiram em média 6l ml. Os valores de pH foram determinados potenciomètricamente (Tabela XIII). O material foi igualmente acondicionado em frasco plástico e conservado em congelador à temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ .

3.1.4.2 - Preparação do sôro oxalatado:- 100 mg de cristais de oxalato de potássio foram adicionados a cada 100 ml de sôro sanguíneo "in natura", seguindo-se agitação, centrifugação a 10.000 rpm, durante 5 minutos, acondicionamento do sobrenadante em frasco plástico e conservação em congelador à temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ . Os valores de pH foram determinados potenciomètricamente (Tabela XIII).

3.1.4.3 - Preparação do sôro citratado:- 100 mg de cristais de citrato de sódio foram adicionados a cada 100 ml de sôro sanguíneo "in natura", seguindo-se agitação, centrifugação a 10.000 rpm, durante 5 minutos, acondicionamento em frasco plástico e conservação em congelador à temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ . Os valores de pH foram determinados potenciomètricamente (Tabela XIII).

3.1.4.4 - Preparação do sôro com EDTA:- 100 mg de cristais de ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) foram adicionados a cada 100 ml de sôro sanguíneo "in natura", seguindo-se agitação, centrifugação a 10.000 rpm, durante 5 minutos, acondicionamento do sobrenadante em frasco plástico e conservação em congelador à temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ . Os valores de pH foram determinados potenciomètricamente (Tabela XIII).

3.1.4.5 - Preparação dos sôros precipitados:- 200 ml de sôro integral foram aquecidos a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. O material foi em seguida centrifugado, sendo o sobrenadante recolhido, acondicionado em frasco plástico e guardado em congelador a  $-5^{\circ}\text{C}$ . Os valores de pH atingidos após a precipitação foram medidos potenciomètricamente (Tabela XIII). Amostras de sôros desproteinizados foram submetidas à verificação das extensões das desproteinações conseguidas, pelos testes do biureto (2) e do álcool absoluto (3). Observou-se que foi eliminado todo o conteúdo proteínico do sôro.

### 3.2 - MÉTODO

#### 3.2.1 - Esquema das experimentações:

SÉRIE A - Animais nº 1, 2, 3, 4 e 5.

Tecido:- cérebro

Meios de suspensão:- sôro homólogo (I), sôro heterólogo - (II), sôro dialisado (III), sôro oxalatado (IV), sôro citratado (V), sôro com EDTA (VI) e sôro precipitado pelo calor (VII).

Atmosfera ambiente

SÉRIE B - Animais nº 6, 7 e 8.

Tecido:- cérebro

Meios de suspensão:- sôro homólogo diluído (I), sôro heterólogo diluído (II), sôro dialisado diluído (III), sôro oxalatado diluído (IV), sôro citratado diluído (V), sôro oxalatado diluído (IV), sôro citratado diluído (V), sôro com EDTA diluído (VI) e sôro precipitado diluído (VII).

Atmosfera ambiente.

Designações para os tratamentos aplicados segundo o planejamento estatístico:

SÉRIE A - Blocos ao acaso: animais 1, 2, 3, 4 e 5

Tratamentos:

- I Cérebro + sôro homólogo
- II Cérebro + sôro heterólogo
- III Cérebro + sôro heterólogo dialisado
- IV Cérebro + sôro heterólogo oxalatado
- V Cérebro + sôro heterólogo citratado
- VI Cérebro + sôro heterólogo com EDTA
- VII Cérebro + sôro heterólogo precipitado

SÉRIE B - Blocos ao acaso:- animais 6, 7 e 8.

Tratamentos:

- I Cérebro + sôro homólogo diluído
- II Cérebro + sôro heterólogo diluído
- III Cérebro + sôro heterólogo dialisado, diluído

- IV Cérebro e soro heterólogo oxalatado, diluído
- V Cérebro + soro heterólogo citratado, diluído
- VI Cérebro + soro heterólogo com EDTA, diluído
- VII Cérebro + soro heterólogo precipitado, diluído

### 3.2.2 - Sistemas estabelecidos para a respirometria

A respirometria foi pelo método direto de Warburg (39), estabelecendo-se para tanto, os seguintes sistemas:

#### SÉRIE A - Sistemas de I a VII:

volume do meio de suspensão ..... 2,60 ml  
 volume da massa (fatias de tecido) ..... 0,90 ml  
 volume de KOH a 20% ..... 0,20 ml  
 volume final ..... 3,70 ml  
 fase gasosa: ar atmosférico ambiente.  
 temperatura:- 38,5°C  
 tempo de equilíbrio:- 10 minutos  
 agitações:- 80 ciclos por minuto

Observação:- os diferentes meios de suspensão utilizados - foram os correspondentes aos diferentes tratamentos da série A, citados em 3.2.1..

#### SÉRIE B - SISTEMAS DE I a VII

volume do meio de suspensão ..... 2,60 ml  
 volume da massa (fatias de tecido) ..... 0,90 ml  
 volume de KOH a 20% ..... 0,20 ml  
 volume final ..... 3,70 ml  
 fase gasosa:- ar atmosférico ambiente  
 temperatura:- 38,5°C  
 tempo de equilíbrio:- 10 minutos  
 agitações:- 80 ciclos por minuto

Observação:- Os diferentes meios de suspensão utilizados - foram os correspondentes aos diferentes tratamentos da série B, citados em 3.2.1..



3.2.3 - Os intervalos de tempo decorridos entre o abate dos animais e o início das leituras em Warburg, oscilaram - entre 90 e 100 minutos.

3.2.4 - As leituras foram executadas a intervalos de 15 minutos num total de três horas. Apenas na primeira experiência, os intervalos foram de 10 minutos, o que levou a permitir, fossem as demais leituras, feitas em intervalos maiores.

3.2.5 - Determinações complementares:

1 Após as três horas de respirometria em Warburg, cada sistema foi submetido ao seguinte processamento:-

- 1 - Retirada do papel de filtro embebido em KOH a 20%, por meio de pinça e sucção em bomba de vácuo, do álcali - restante, sendo o poço central lavado duas vezes, com água destilada.
- 2 - Transferência quantitativa do conteúdo dos frascos de Warburg para tubos de centrífuga.
- 3 - Centrifugação por 5 min a 10.000 rpm.
- 4 - Determinação dos valores de pH finais dos líquidos sobrenadantes (meios de suspensão).
- 5 - Ressuspensões por três vezes, do material centrifugado (fatias do tecido), em KCl 0,154 M, seguidas das - centrifugações respectivas.
- 6 - Transferências dos materiais depositados, após a última centrifugação, para cadinhos de porcelana, previamente tarados, para determinação das massas secas.

3.2.5.1 - Determinação das massas secas

As determinações das massas secas obedeceram aos critérios clássicos e usuais.

3.2.5.2 - Determinação dos valores de pH iniciais dos meios de suspensão

Após as centrifugações e coletas descritas em 3.1.4, os

sobrenadantes foram submetidos à determinação potenciométrica de seus valores de pH, o mesmo acontecendo com o sôro dialisado, após o processamento da diálise.

### 3.2.5.3 - Determinação dos valores de pH dos meios de suspensão após a respirometria

Após a centrifugação citada em 3.2.5.3, os sobrenadantes foram recolhidos para determinações potenciométricas dos valores de pH de cada sobrenadante.

### 3.2.5.4 - Determinação do conteúdo em cálcio dos sôros sanguíneos

Amostras dos sôros sanguíneos integrais e tratados foram submetidas à dosagens de cálcio por método permanganométrico (4).

### 3.2.5.5 - Experimento complementar - animal nº 9

Experimento complementar visando relacionar as três situações relativas à dinâmica do transporte de oxigênio gasoso entre atmosfera, meio líquido de suspensão e tecidos em metabolismo aeróbico, foi realizado nas seguintes condições:

#### a) Sistema:

volume do meio de suspensão ..... 2,60 ml  
volume da massa (fatias de tecido) ..... 0,50 ml  
volume de KOH a 20% ..... 0,20 ml  
volume final ..... 3,70 ml  
temperatura:- 38,5°C

tempo de equilíbrio:- 10 minutos

agitações:- 80 ciclos por minuto

b) Tensões parciais de oxigênio nas atmosferas de trabalho em Warburg: 20%, 35%, 50%, 65%, 85% e 100%.

Nos demais aspectos referentes à respirometria, foram sempre seguidas as condições experimentais já descritas.

\*

\*

\*

4 - RESULTADOS

Os resultados das observações respirométricas (consumo de oxigênio, em microlitros), da pesquisa e do experimento complementar, estão apresentados em apêndice.

Os resultados das relações entre consumo de oxigênio e massa seca dos tecidos ( $QO_2$  em sentido restrito de definição aos 60 minutos e em sentido amplo nos diferentes intervalos de tempos considerados), bem como das determinações das massas secas, dos valores de pH iniciais e finais dos sistemas utilizados em Warburg, dos dados - controles da diálise e teores de cálcio nos sôros sanguíneos, estão apresentados em tabelas, permitindo melhor disposição dos mesmos.

Nas tabelas I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII estão apresentadas, respectivamente, as relações entre consumo de oxigênio e massa seca de cada tecido correspondente, para todos os tratamentos aplicados aos tecidos dos oito animais, das duas séries de pesquisa.

Nas tabelas IX e X estão apresentados os valores de  $QO_2$ , - correspondentes às duas séries da pesquisa, isolados das tabelas I e VIII, os quais foram submetidos aos tratamentos da análise estatística.

Nas tabelas XI e XII figuram os valores encontrados para as massas secas, correspondentes às massas úmidas dos tecidos colocados em Warburg e relativas às duas séries da pesquisa. Os valores expostos nestas tabelas, relacionados àqueles apresentados em apêndice (tabelas XXVIII a XXXV) permitiram a determinação dos valores figurados nas tabelas de número I a VIII e IX a X.

As figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mostram curvas analíticas, delineadas sob mesma escala, possibilitando a visualização gráfica da intensidade, velocidade e eficiência das atividades respiratórias das fatias de tecido nervoso (córtex cerebral), colocadas em Warburg, sob diferentes tratamentos, correspondentes às duas séries da pesquisa.

A figura 9 mostra a curva analítica traçada a partir dos resultados do experimento respirométrico complementar, evidenciando graficamente o comportamento do tecido nervoso (córtex cerebral) - frente a diferentes tensões de oxigênio atmosférico, durante a respirometria.

Na tabela XIII estão apresentados os valores de pH determinados potenciomètricamente, nos meios de suspensão que compuseram os sistemas utilizados em Warburg, antes da respirometria e correspondentes às duas séries da pesquisa.

As tabelas XIV e XV apresentam os valores de pH, igualmente determinados potenciomètricamente, nos meios de suspensão que compuseram os sistemas utilizados em Warburg, após a respirometria e correspondentes às duas séries da pesquisa.

Na tabela XVI figuram os dados correspondentes ao contròle do processo de dialisação a que foram submetidas amostras de sôro sanguíneo, após o que serviram como meio de suspensão em sistemas estabelecidos em Warburg (tratamento III da série A e III da série B).

A tabela XVII apresenta os resultados de observações efetuadas no sentido de se aclarar as condições iônicas dos meios de suspensão utilizados em Warburg, mostrando especificamente os teores de cálcio nos sôros sanguíneos.

Na tabela XVIII estão os valores de  $QO_2$  correspondentes ao experimento complementar.

\*

\*

\*

TABELA I

QO<sub>2</sub> PARA CÓRTEX CEREBRAL, DO ANIMAL 1, EM RELAÇÃO AO TEMPO E SOB DI-  
FERENTES TRATAMENTOS

TEMPO EM MINUTOS	T R A T A M E N T O S						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
30	0,49	0,51	0,57	0,46	0,47	0,48	0,49
60	1,03	1,09	1,19	1,00	0,95	1,05	1,04
90	1,40	1,53	1,60	1,45	1,37	1,50	1,52
120	1,87	1,95	1,98	1,91	1,75	1,98	1,92
150	2,27	1,95	2,43	2,33	2,13	2,36	2,39
180	2,70	2,39	2,86	2,72	2,65	2,82	2,86

TABELA II

QO<sub>2</sub> PARA CÓRTEX CEREBRAL, DO ANIMAL 2, EM RELAÇÃO AO TEMPO E SOB DI-  
FERENTES TRATAMENTOS

TEMPO EM MINUTOS	T R A T A M E N T O S						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
30	1,31	1,15	1,59	0,79	0,89	1,39	1,10
60	2,59	2,19	3,21	1,59	1,69	2,20	2,26
90	3,60	3,06	4,49	2,26	2,40	3,16	3,14
120	4,49	3,84	5,64	2,79	2,95	4,03	3,90
150	5,44	4,70	6,79	3,45	3,64	4,91	4,77
180	6,43	5,61	8,06	4,14	4,41	6,07	5,78

TABELA III

QO<sub>2</sub> PARA CÔRTEX CEREBRAL DO ANIMAL 3, EM RELAÇÃO AO TEMPO E SOB DIFERENTES TRATAMENTOS

TEMPO EM MINUTOS	T R A T A M E N T O S						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
30	1,06	1,30	1,72	1,73	1,17	0,91	1,49
60	2,24	2,81	3,42	3,37	2,05	2,07	3,21
90	3,33	4,23	4,95	4,97	3,44	2,79	4,74
120	4,33	5,63	6,43	6,21	3,92	4,01	6,43
150	5,39	7,21	7,87	7,61	5,49	4,51	7,88
180	6,18	8,10	9,14	8,48	5,64	5,82	9,63

TABELA IV

QO<sub>2</sub> PARA CÔRTEX CEREBRAL DO ANIMAL 4, EM RELAÇÃO AO TEMPO E SOB DIFERENTES TRATAMENTOS

TEMPO EM MINUTOS	T R A T A M E N T O S						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
30	0,74	0,62	0,52	1,07	0,75	0,52	0,62
60	1,40	1,24	1,01	1,60	1,44	1,63	1,22
90	2,17	1,99	1,57	2,17	2,33	2,56	1,90
120	2,73	2,43	1,83	2,44	2,82	3,11	2,31
150	3,31	3,02	2,21	2,89	3,52	3,79	2,82
180	5,22	4,69	3,16	4,21	5,50	5,66	4,36

TABELA V

QO<sub>2</sub> PARA CÔRTEX CEREBRAL DO ANIMAL 5, EM RELAÇÃO AO TEMPO E SOB DIFERENTES TRATAMENTOS

TEMPO EM MINUTOS	T R A T A M E N T O S						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
30	0,89	0,82	0,44	0,58	0,72	0,67	0,80
60	1,88	1,89	0,82	1,15	1,59	1,48	1,75
90	2,69	2,65	1,14	1,79	2,33	2,30	2,50
120	3,67	3,63	1,39	2,50	3,17	2,97	3,38
150	4,56	4,56	1,64	3,17	3,92	3,73	4,17
180	5,40	5,39	1,92	3,73	4,64	4,39	4,96

TABELA VI

QO<sub>2</sub> PARA CÔRTEX CEREBRAL DO ANIMAL 6, EM RELAÇÃO AO TEMPO E SOB DIFERENTES TRATAMENTOS

TEMPO EM MINUTOS	T R A T A M E N T O S						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
30	0,51	0,67	0,71	0,51	1,17	0,53	0,59
60	1,00	1,26	1,86	1,04	1,56	0,57	1,11
90	1,65	2,10	2,56	1,73	2,24	1,61	1,82
120	2,31	2,96	3,60	2,44	2,88	2,32	2,57
150	2,96	3,77	4,40	3,13	3,55	2,96	3,33
180	3,58	4,55	5,22	3,90	4,21	3,72	4,14

TABELA VII

QO<sub>2</sub> PARA CÓRTEX CEREBRAL DO ANIMAL 7, EM RELAÇÃO AO TEMPO E SOB DI-  
FERENTES TRATAMENTOS

TEMPO EM MINUTOS	T R A T A M E N T O S						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
30	0,88	0,67	0,49	0,95	0,69	0,68	1,03
60	1,73	1,39	1,16	1,77	1,44	1,42	2,21
90	2,46	1,98	1,72	2,56	2,12	2,08	3,25
120	3,37	2,77	2,29	3,59	2,90	2,93	4,54
150	4,23	3,48	2,84	4,94	3,61	3,91	5,89
180	4,80	4,00	3,27	6,20	4,21	4,71	7,01

TABELA VIII

QO<sub>2</sub> PARA CÓRTEX CEREBRAL DO ANIMAL 8, EM RELAÇÃO AO TEMPO E SOB DI-  
FERENTES TRATAMENTOS

TEMPO EM MINUTOS	T R A T A M E N T O S						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
30	0,67	0,73	0,59	0,54	0,70	0,61	0,83
60	1,51	1,77	1,64	1,33	1,56	1,20	1,89
90	2,15	2,65	2,44	2,04	2,24	1,88	2,84
120	2,89	2,65	3,29	2,80	3,07	2,68	3,98
150	3,65	4,86	4,14	3,73	3,99	3,57	5,14
180	4,32	5,91	4,94	4,67	4,78	4,42	6,38



TABELA IX  
SÉRIE A  
QO<sub>2</sub> FUNDAMENTAIS PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA

ANIMAIS TRATAMENTOS	TEMPOS MIN	1			2			3			4			5		
		60	120	180	60	120	180	60	120	180	60	120	180	60	120	180
I		1,03	1,87	2,70	2,59	4,49	6,43	2,24	4,33	6,18	1,40	2,73	4,03	1,88	3,67	5,40
II		1,09	1,95	2,39	2,19	3,84	5,61	2,81	5,63	8,10	1,24	2,43	3,61	1,89	3,63	5,39
III		1,19	1,98	2,86	3,21	5,64	8,06	1,89	3,56	5,13	1,01	1,83	2,55	0,82	1,39	1,92
IV		1,00	1,91	2,72	1,59	2,79	4,14	3,37	6,21	8,48	1,60	2,44	3,40	1,15	2,50	3,73
V		0,95	1,75	1,96	1,69	2,95	4,41	2,05	3,92	5,64	1,44	2,82	4,24	1,59	3,17	4,64
VI		1,05	1,98	2,82	2,20	4,03	6,07	2,07	4,01	5,82	1,63	3,11	4,52	1,48	2,97	4,39
VII		1,04	1,92	2,86	2,26	3,90	5,78	3,21	6,43	9,63	1,22	2,31	3,39	1,75	3,38	4,96

TABELA X  
SÉRIE B  
QO<sub>2</sub> FUNDAMENTAIS PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA

TRATAMENTOS	ANIMAIS TEMPOS EM MIN	6			7			8		
		60	120	180	60	120	180	60	120	180
I		1,00	2,31	3,58	1,73	3,37	4,80	1,51	2,89	4,32
II		1,26	2,96	4,55	1,39	2,77	4,00	1,77	2,44	5,91
III		1,86	3,60	5,22	1,16	2,29	3,26	1,64	3,29	4,94
IV		1,04	2,44	3,90	1,77	3,59	6,20	1,33	2,80	4,67
V		1,56	2,88	4,21	1,44	2,90	4,21	1,56	3,07	4,78
VI		0,57	2,32	3,72	1,42	2,93	4,71	1,20	2,68	4,42
VII		1,11	2,57	4,14	2,21	4,54	7,01	1,89	3,98	6,38

TABELA XI  
MASSAS SÊCAS DO TECIDO COLOCADAS EM WARBURG (EM MILIGRAMAS)  
SÉRIE A

ANIMAIS TRATAMENTOS					
	1	2	3	4	5
I	164,1	84,9	102,3	98,0	107,1
II	165,5	82,5	81,5	118,9	85,7
III	149,3	62,1	77,3	111,7	85,4
IV	147,8	105,2	89,8	79,9	133,9
V	171,8	98,4	118,1	99,6	125,3
VI	155,4	62,0	134,2	129,7	124,4
VII	156,4	82,7	100,8	179,0	118,9

TABELA XII  
MASSAS SÊCAS DO TECIDO COLOCADAS EM WARBURG (EM MILIGRAMAS)  
SÉRIE B

ANIMAIS TRATAMENTOS			
	6	7	8
I	117,5	89,1	110,6
II	112,1	99,8	81,4
III	90,1	111,5	74,8
IV	133,6	100,1	99,7
V	134,4	112,2	93,8
VI	178,3	126,3	120,2
VII	158,2	81,7	108,5

$QO_2$  DE CÓRTEX CEREBRAL

TRATAMENTOS I, II, III, IV, V, VI e VII

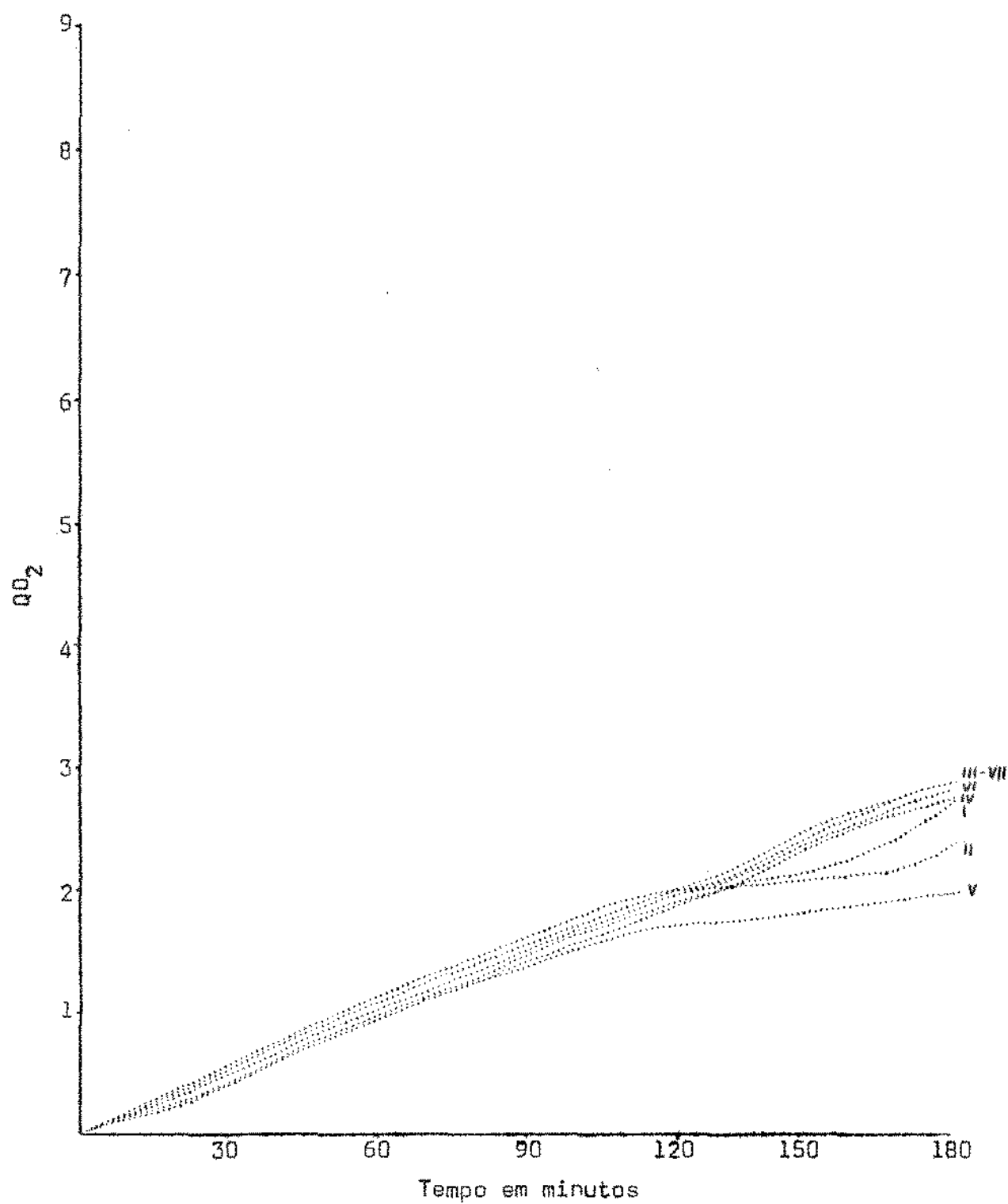
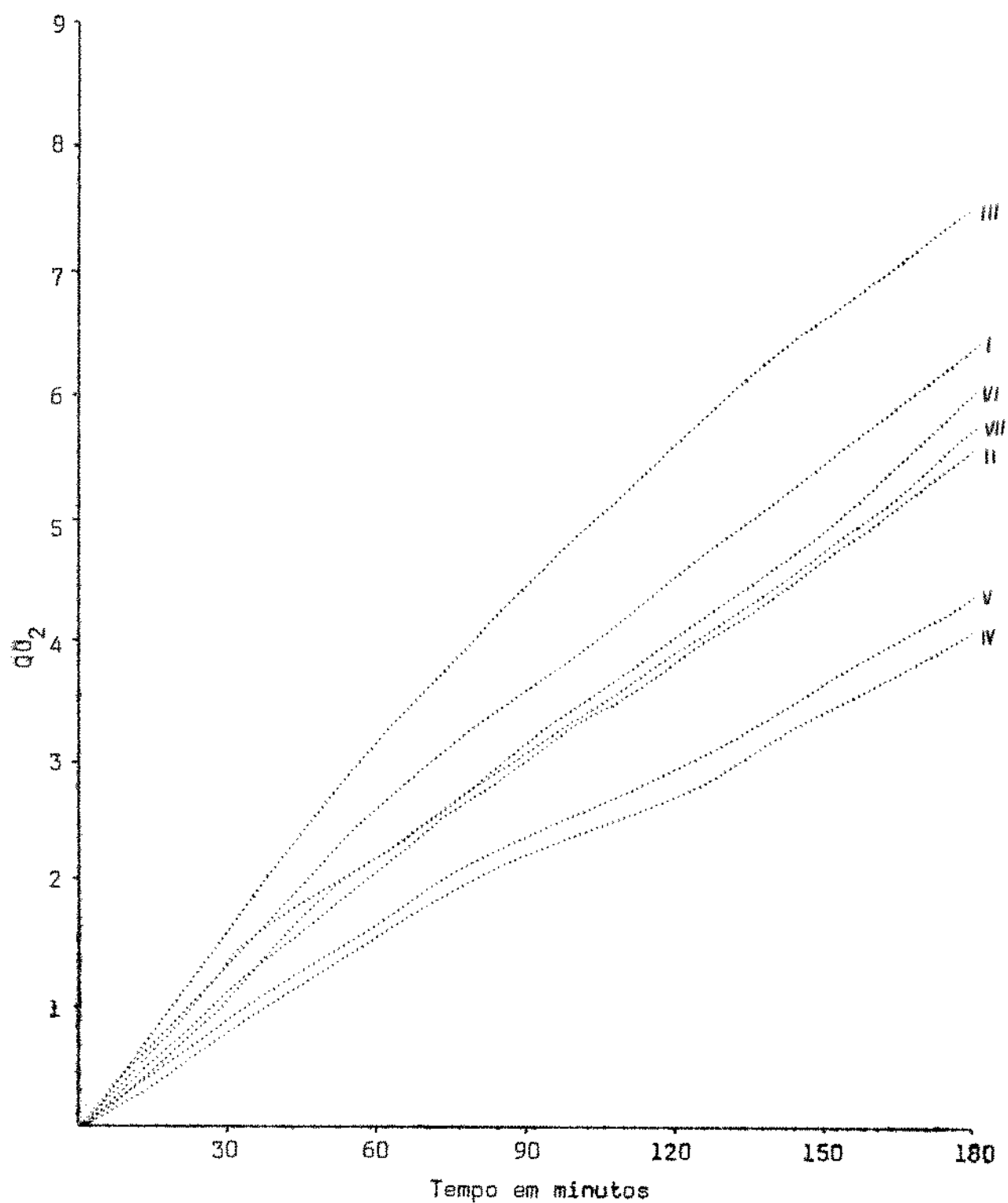


FIG. 2 - ANIMAL 2 - SÉRIE A

 $QO_2$  DE CÓRTEX CEREBRAL

TRATAMENTOS I, II, III, IV, V, VI e VII



QO<sub>2</sub> DE CÓRTEX CEREBRAL

TRATAMENTOS I, II, III, IV, V, VI e VII

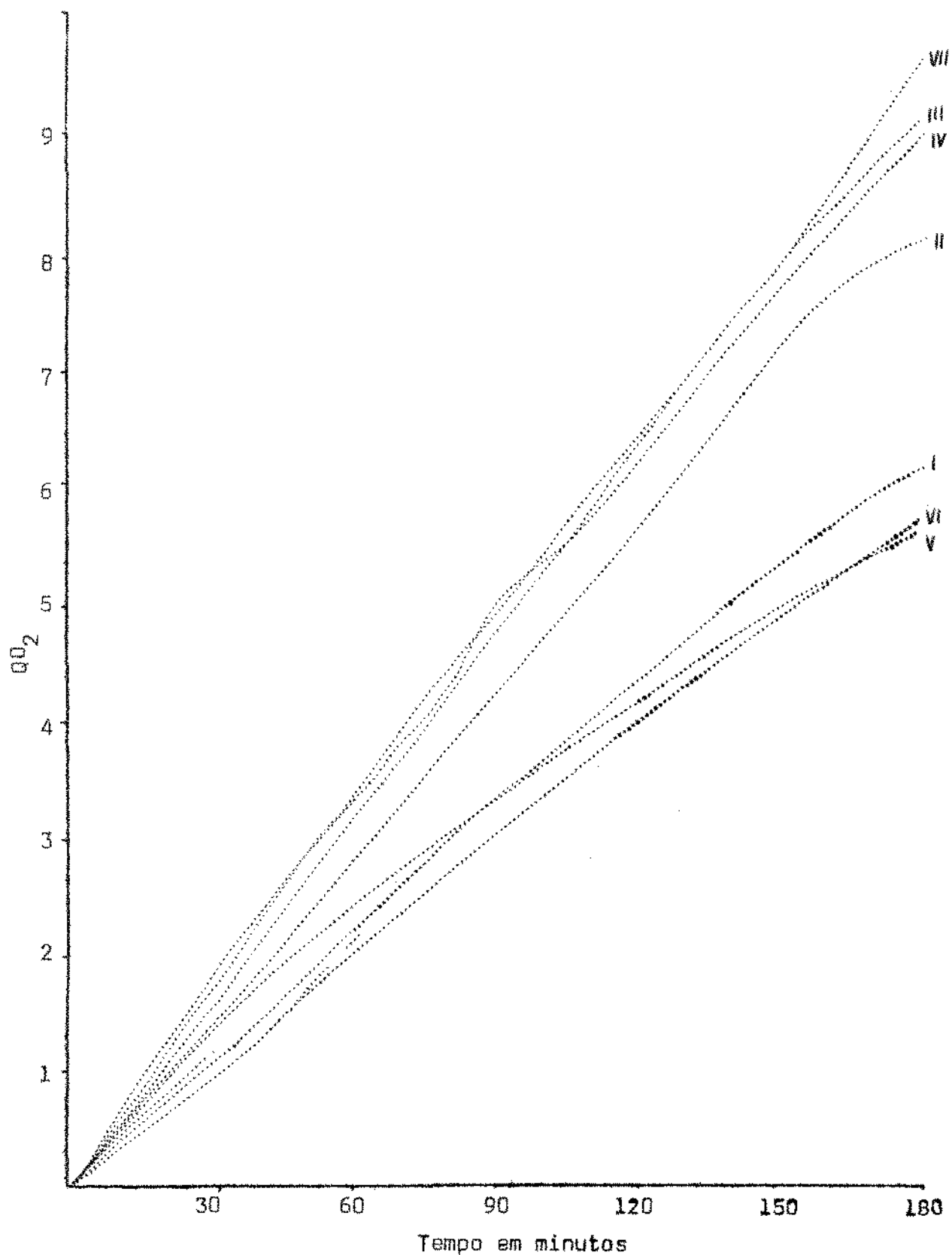


FIG. 4 - ANIMAL Nº 4 - SÉRIE A

$QO_2$  DE CÓRTEX CEREBRAL

TRATAMENTOS I, II, III, IV, V, VI e VII

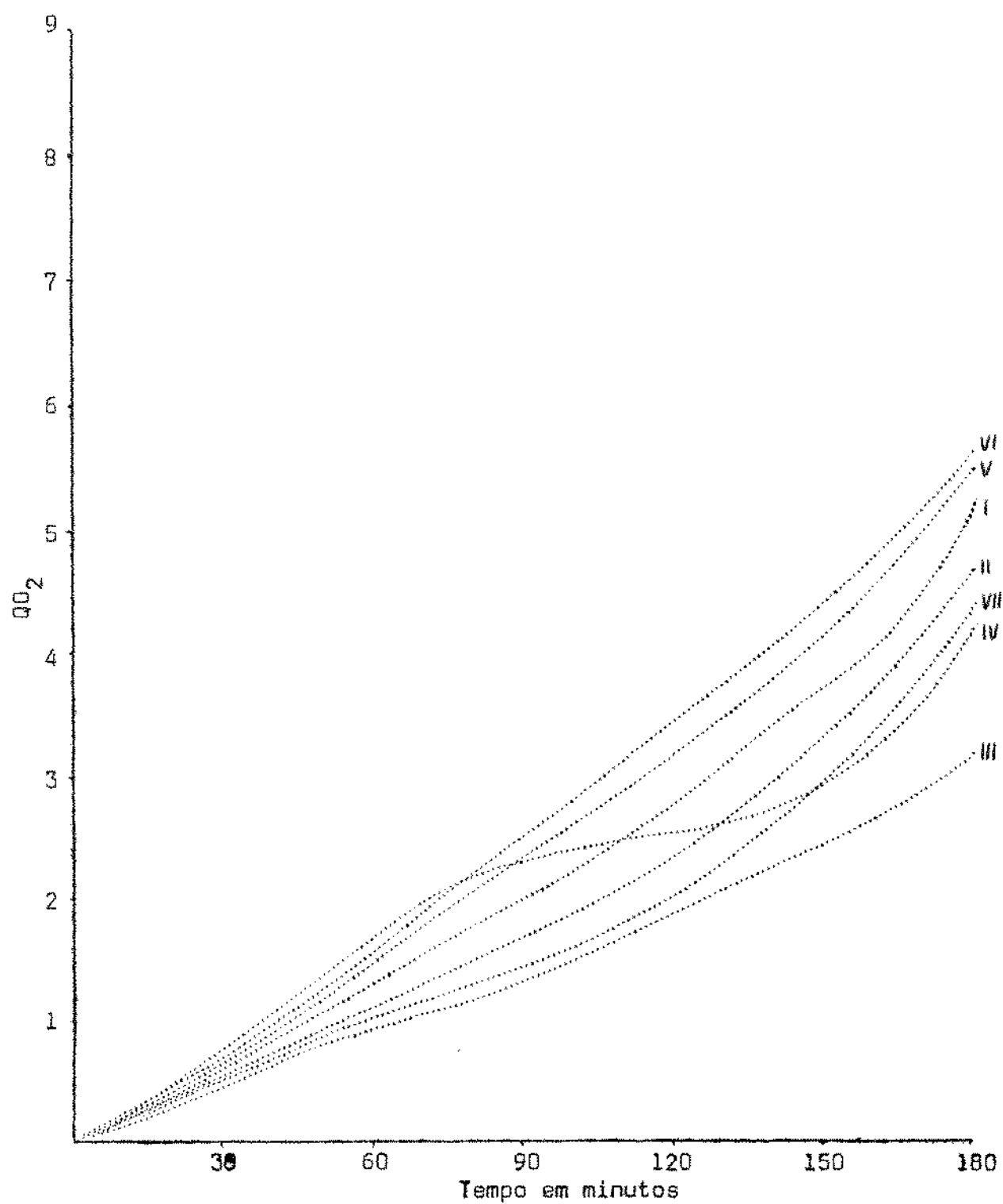
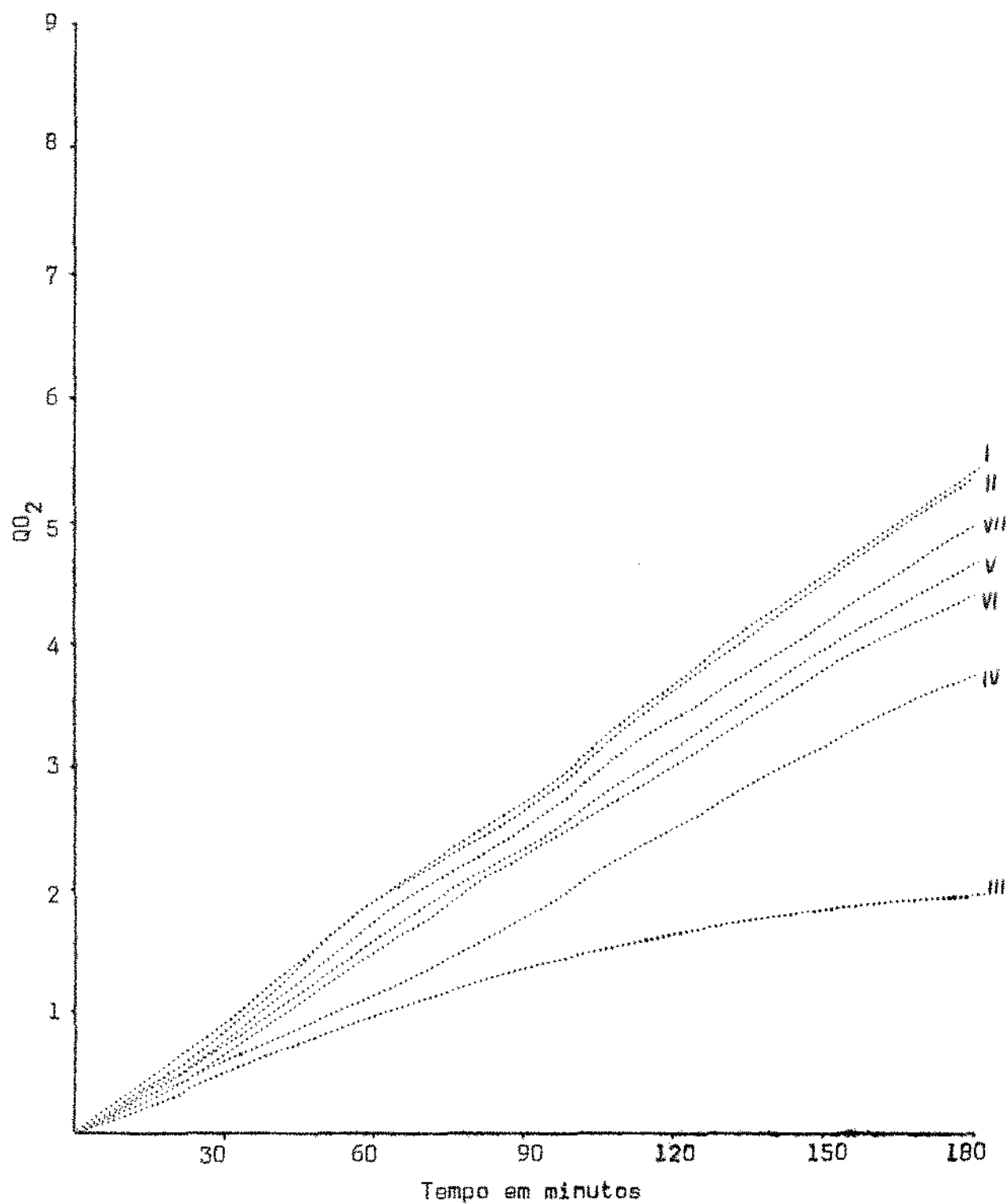


FIG. 5 - ANIMAL Nº 5 - SÉRIE A

 $QO_2$  DE CÓRTEX CEREBRAL

TRATAMENTOS I, II, III, IV, V, VI e VII





$QO_2$  DE CÓRTEX CEREBRAL

TRATAMENTOS I, II, III, IV, V, VI e VII

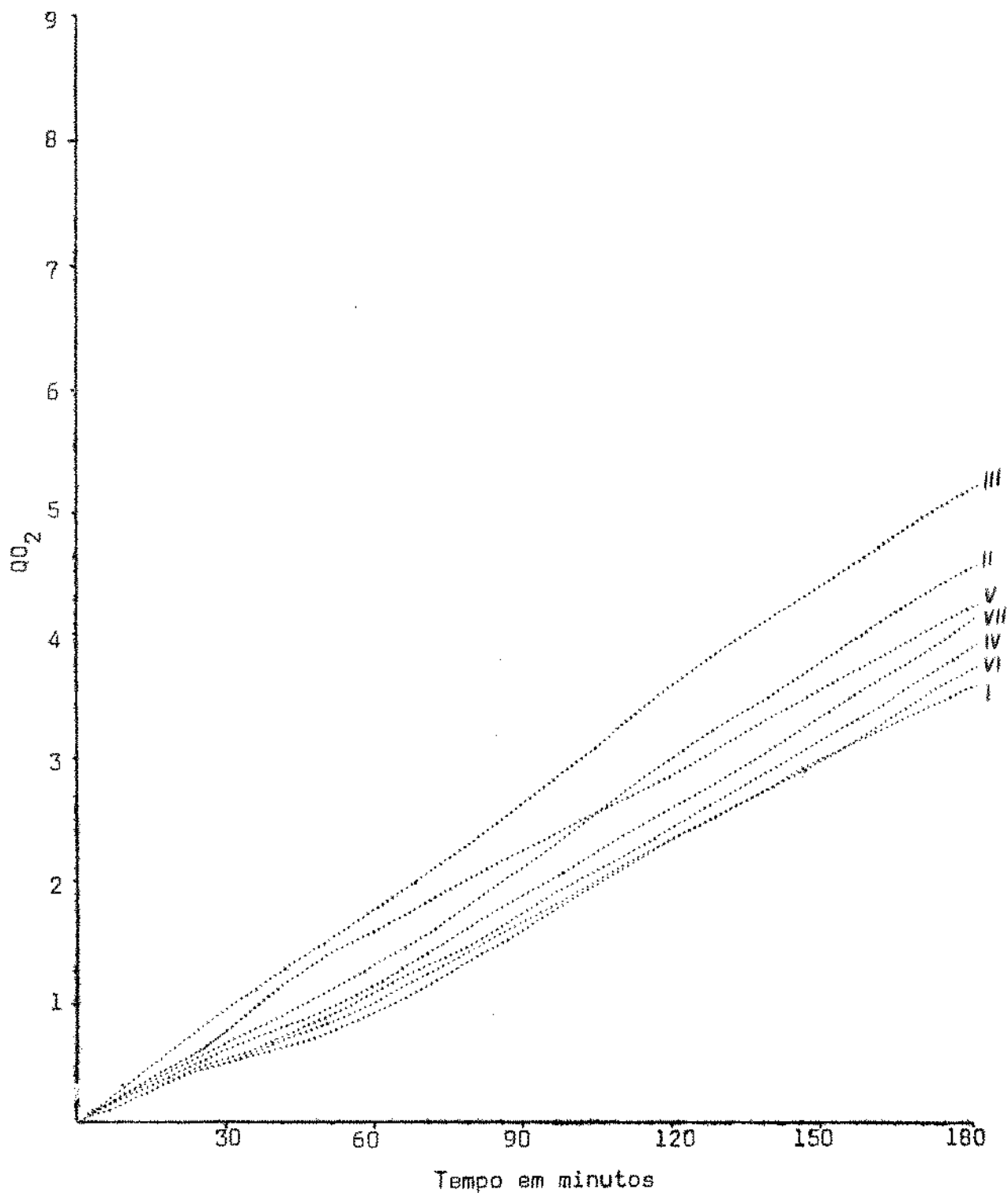


FIG. 7 - ANIMAL Nº 7 - SÉRIE 3

QO<sub>2</sub> DE CÓRTEX CEREBRAL

TRATAMENTOS I, II, III, IV, V, VI e VII

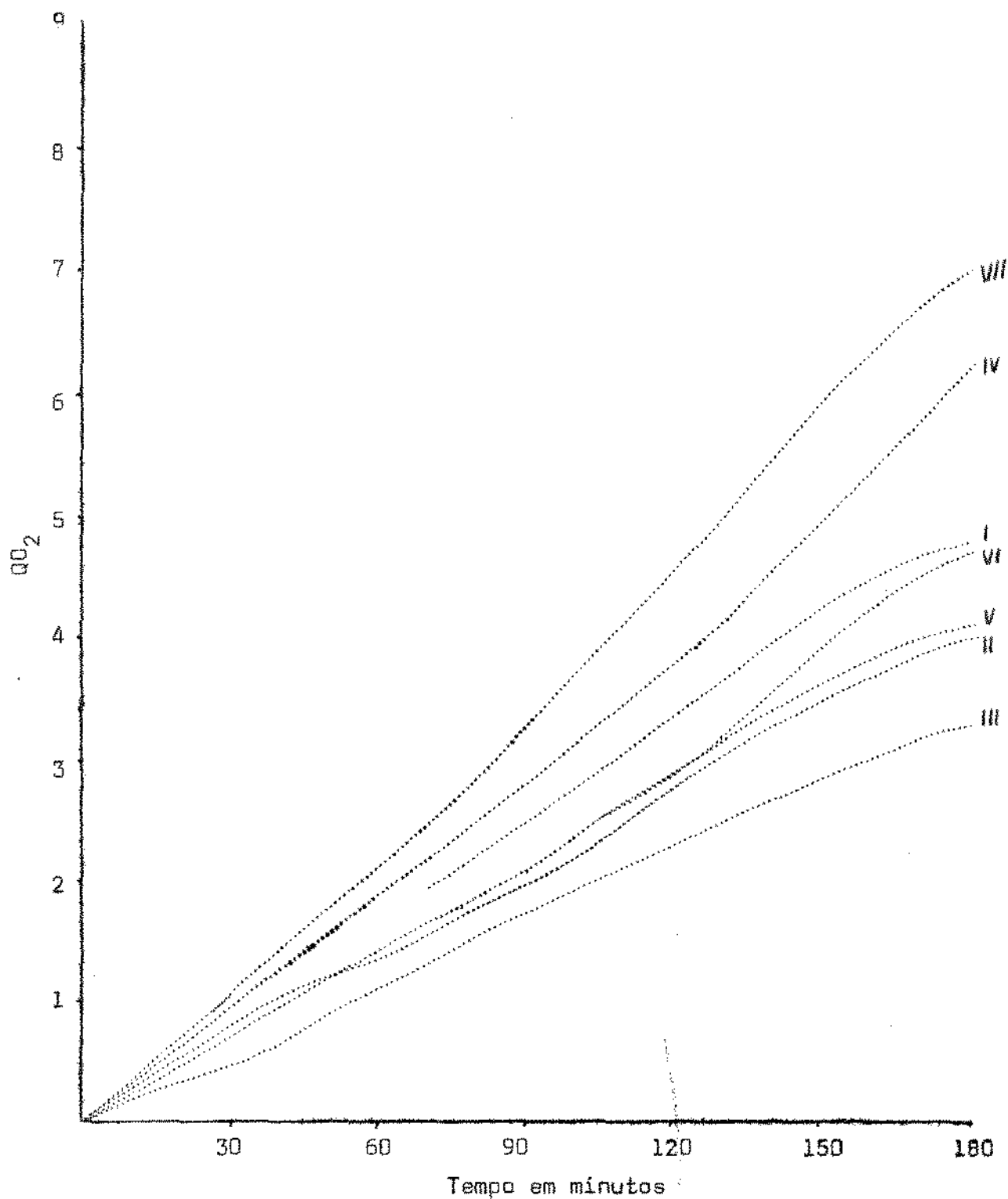


FIG. 8 - ANIMAL Nº 8 - SÉRIE B

$QO_2$  DE CÓRTEX CEREBRAL

TRATAMENTOS I, II, III, IV, V, VI e VII

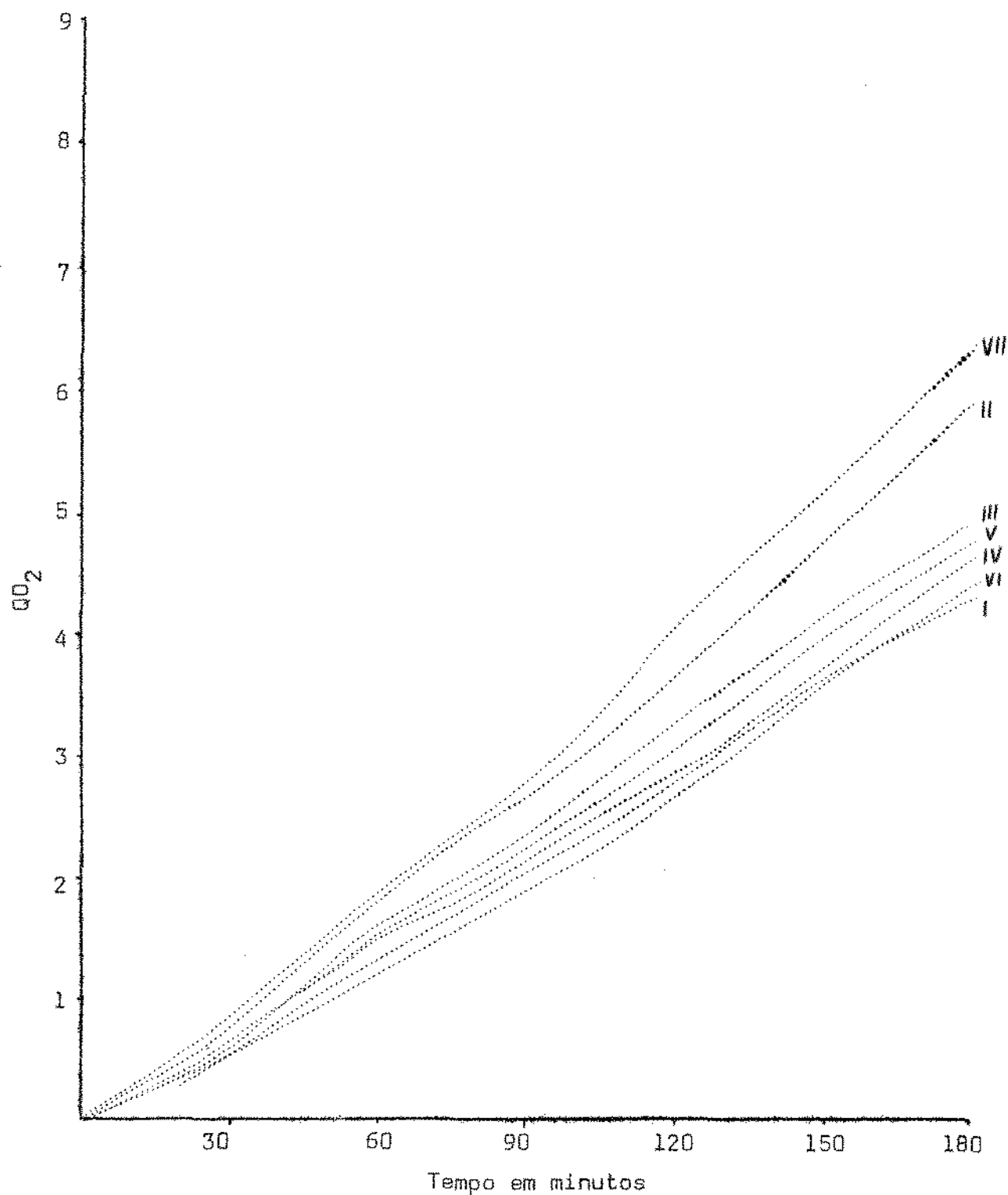


FIG. 9 - ANIMAL Nº 9 -

EXPERIMENTO COMPLEMENTAR -  $QO_2$  de Córtex  
Cerebral sob diferentes tensões de oxigênio

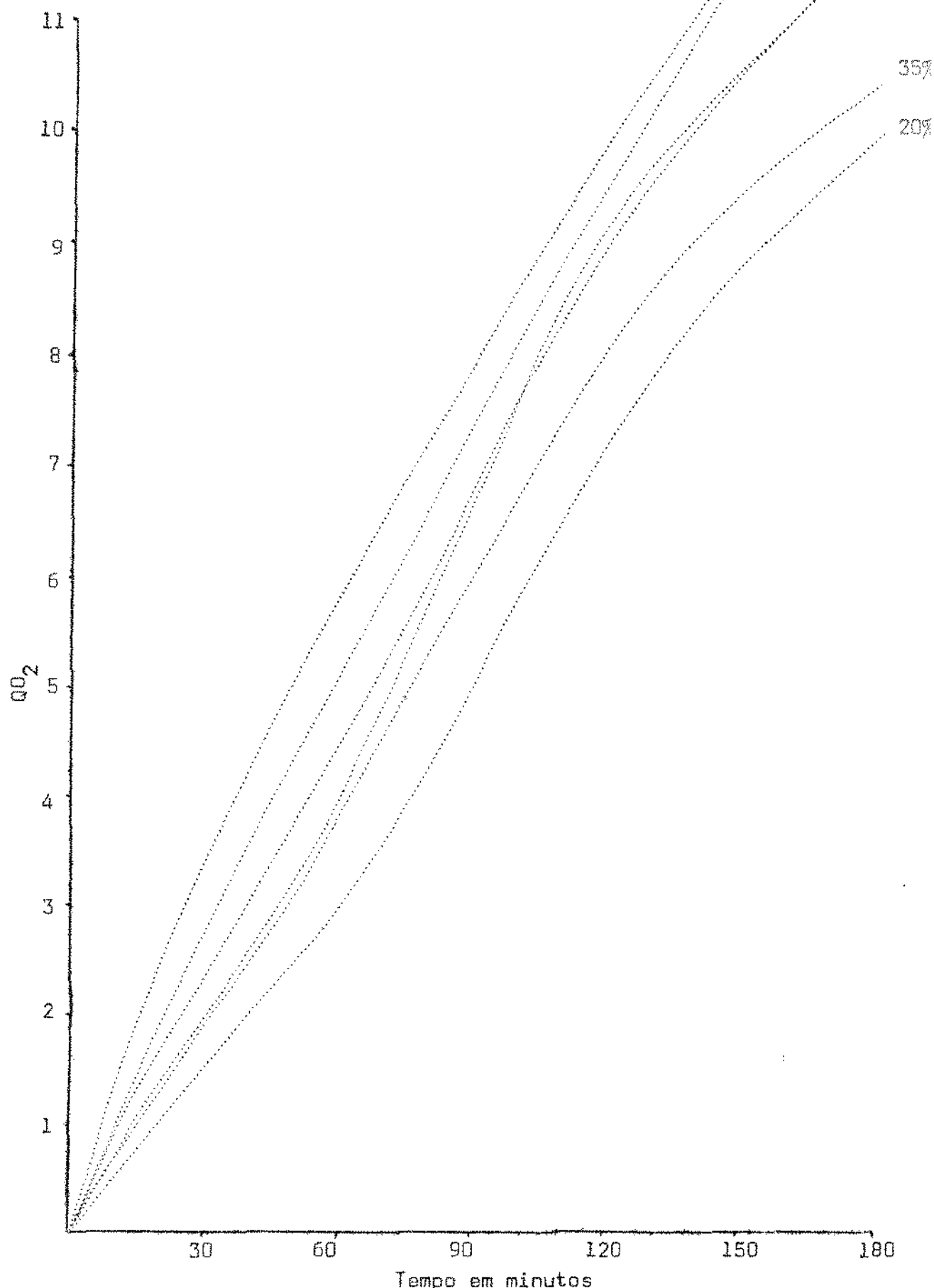


TABELA XIII  
VALORES INICIAIS DE pH OBTIDOS DOS SISTEMAS UTILIZADOS EM  
WARBURG

TRATAMENTOS	SÉRIE A	SÉRIE B
I	7,70	7,40
II	- - -	- - -
III	7,50	7,40
IV	7,70	7,60
V	7,70	7,65
VI	7,70	7,55
VII	7,70	7,40

TABELA XIV

VALORES FINAIS DE pH OBTIDOS DOS SISTEMAS UTILIZADOS EM WARBURG

SÉRIE A

ANIMAIS TRATAMENTOS						MÉDIAS
	1	2	3	4	5	
I	7,80	7,75	7,90	7,60	7,15	7,640
II	7,70	7,65	7,80	7,15	6,80	7,450
III	7,25	7,50	7,15	6,20	6,15	6,850
IV	7,95	7,80	7,80	8,45	8,35	8,070
V	7,65	7,95	7,75	8,25	8,20	7,960
VI	7,45	7,60	7,35	8,00	8,30	7,720
VII	8,00	8,00	8,00	7,00	7,10	7,620

TABELA XV

VALORES FINAIS DE pH OBTIDOS DOS SISTEMAS UTILIZADOS EM WARBURG

SÉRIE B

ANIMAIS TRATAMENTOS				MÉDIAS
	6	7	8	
I	7,05	7,10	7,30	7,150
II	7,35	7,20	7,30	7,283
III	7,00	6,85	7,10	6,983
IV	7,20	7,40	7,30	7,300
V	7,80	7,40	7,40	7,533
VI	7,40	7,55	7,20	7,383
VII	7,40	7,65	7,40	7,483

TABELA XVI

VARIAÇÃO DE VOLUME E VALOR DE pH DO SÔRO SANGUÍNEO INTEGRAL APÓS  
DIÁLISE CONTRA TAMPÃO FOSFATO 0,001 M, pH 7,40

MÉDIA DOS VOLUMES INICIAIS EM ml	MÉDIA DOS VOLUMES FINAIS EM ml	MÉDIA DOS VALORES DE pH APÓS DIÁLISE
50	61,33	7,50

TABELA XVII

DOSAGEM DE CÁLCIO NOS SÔROS SANGUÍNEOS INTEGRAL E TRATADOS

SÔROS	mg%
integral	11,00
precipitado	4,15
dialisado	2,50
com EDTA	0,30
oxalatado	0,30
citratoado	8,50

TABELA XVIII

CO<sub>2</sub> PARA FATIAS DE CÓRTEX CEREBRAL SUSPENSAS EM TAMPÃO KREBS-RINGER  
FOSFATO pH 7,40, EM RELAÇÃO AO TEMPO E A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  
OXIGÊNIO - ANIMAL Nº 9

TEMPO EM MINUTOS % DE OXIGÊNIO	60	120	180
20	3,19	7,27	10,01
35	4,30	8,15	10,47
50	5,91	10,32	12,68
65	4,79	9,58	11,85
85	4,61	9,29	11,80
100	5,14	9,68	12,99

## 5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos às seguintes análises:

- a) Análise de variância, de acordo com o método recomendado por SNEDECOR (11), com desdobramento das interações significativas.
- b) Teste de TUKEY (21), visando comparar pares das médias, nos efeitos significativos da análise de variância.
- c) Cálculo do coeficiente de variação de PEARSON (5), para comparar as duas séries, quanto à variabilidade.

O nível de significância adotado foi de 5%. Para efeito de ilustração, adotamos a indicação da significância usada por PIMENTEL GOMES (21), que coloca à frente do valor de "F" observado, um asterisco quando  $0,01 < p < 0,05$  e dois asteriscos quando  $p < 0,01$ . Quando o valor não é seguido de asterisco, considera-se como não significativo.



5.1 - SÉRIE A

Os valores obtidos para os  $QO_2$  da série A foram submetidos à análise de variância, cujos resultados são apresentados na tabela XIX.

O coeficiente de variação para esta série foi 12,08%:

TABELA XIX  
ANÁLISE DE VARIÂNCIA -  $QO_2$  DA SÉRIE A

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Animais .....	4	115,1673	28,7918	190,17**
Tratamentos .....	6	7,3428	1,2238	8,08**
Tempos .....	2	151,8421	75,9210	501,45**
Animais x Tratamentos .....	24	48,3433	2,0143	13,30**
Animais x Tempos .....	8	27,2493	2,1561	14,24**
Tratamentos x Tempos .....	12	1,8794	0,1566	1,03
Resíduo .....	48	7,2684	0,1514	
TOTAL .....	104	349,0926		

Pela análise de variância, as causas de variação "animais" "tratamentos" e "tempos" foram significativas. Foi então aplicado o teste de TUKEY (20) para a comparação entre as médias, consideradas duas a duas.

Para a causa de variação "animais" o valor de  $\Delta$  foi 0,35, e as médias foram:

Animais:- 1 - 1,86  
2 - 3,99  
3 - 4,79  
4 - 2,52  
5 - 2,92

Com base nestes valores, verifica-se que todas as médias - diferiram entre si significativamente.

Para a causa de variação "tratamentos", o valor de  $\Delta$  foi 0,44 e as médias foram as seguintes:

Tratamentos:- I - 3,40  
 II - 3,47  
 III - 2,87  
 IV - 3,11  
 V - 2,88  
 VI - 3,21  
 VII - 3,60

Pode-se verificar que neste caso foram significativos apenas sete contrastes, mesmo assim de forma desordenada.

Para a causa de variação "tempos", o valor de  $\Delta$  foi de 0,20 e as médias foram as seguintes:

Tempos:- 60 minutos - 1,73  
 120 minutos - 3,23  
 180 minutos -- 4,68

Neste caso todos os contrastes foram significativos.

Pela análise de variância (Tabela XIX) pode-se ainda constatar que foram significativas as interações "animais x tratamentos" e "animais x tempos", cujos desdobramentos são apresentados na tabela XX.

TABELA XX  
DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES "ANIMAIS X TRATAMENTOS" E "ANIMAIS X TEMPOS"

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento dentro de animais:				
Animal 1	6	0,3945	0,0657	0,43
Animal 2	6	15,8073	2,6345	17,40**
Animal 3	6	24,3467	4,0578	26,80**
Animal 4	6	3,1149	0,5191	3,42**
Animal 5	6	12,0226	2,0038	13,23**
Tempo dentro de animais:				
Animal 1	2	9,0806	4,5403	29,98**
Animal 2	2	43,8467	21,9233	144,80**
Animal 3	2	70,2148	35,1074	231,88**
Animal 4	2	18,7458	9,3729	61,90**
Animal 5	2	27,2034	13,6017	89,83**

O teste de TUKEY (20) foi aplicado às médias dos desdobramentos, da forma como segue:

a) Tratamento dentro de animais - o valor de  $\Delta$  foi 0,96 e as médias estão na tabela XXI.

TABELA XXI

MÉDIAS DE  $QO_2$  PARA TRATAMENTOS DENTRO DE ANIMAIS SEGUNDO O TRATAMENTO E O ANIMAL

ANIMAIS TRATAMENTOS					
	1	2	3	4	5
I	1,87	4,50	4,25	2,72	3,65
II	1,89	3,88	5,51	2,43	3,64
III	2,01	5,64	3,53	1,80	1,38
IV	1,88	2,84	6,02	2,48	2,34
V	1,55	3,02	3,87	2,81	3,13
VI	1,95	4,10	3,97	3,09	2,95
VII	1,94	3,98	6,42	2,31	3,36

Nêste caso, para o animal 1 não foi observado nenhum contraste significativo. O animal 4 apresentou apenas dois contrastes significativos, enquanto que os animais 2, 3 e 5 apresentaram vários contrastes significativos, porém de forma desordenada.

b) Tempos dentro de animais - para testar a significância dos contrastes desta interação, o valor de  $\Delta$  foi 0,51 e as médias foram as expostas na tabela XXII.

Nêste caso, todos os contrastes foram significativos.

TABELA XXII

MÉDIAS DE  $QO_2$  PARA TEMPOS DENTRO DE ANIMAIS, SEGUNDO O TEMPO E O ANIMAL

ANIMAIS TEMPOS EM MINUTOS					
	1	2	3	4	5
60	1,05	2,25	2,52	1,36	1,51
120	1,90	3,95	4,87	2,52	2,96
180	2,66	5,78	7,00	3,68	4,29

5.2 - SÉRIE B

Os valores de  $QO_2$  obtidos na série B foram submetidos à análise de variância, cujos resultados estão apresentados na tabela XXIII.

O coeficiente de variação para esta série foi de 11,80%.

TABELA XXIII  
ANÁLISE DE VARIÂNCIA -  $QO_2$  DA SÉRIE B

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Animais .....	2	3,6938	1,8469	14,21**
Tratamentos .....	6	6,3955	1,0659	8,20**
Tempos .....	2	111,8869	55,9434	430,33**
Animais x Tratamentos .....	12	12,0060	1,0005	7,70**
Animais x Tempos .....	4	0,7307	0,1827	1,40
Tratamentos x Tempos .....	12	2,2269	0,1856	1,43
Resíduo .....	24	3,1209	0,1300	
TOTAL .....	62	140,0607		

Pela análise de variância, observa-se que as causas de variação "animais", "tratamentos" e "tempos", foram significativas. - Foi, então aplicado o teste de TUKEY (20) para a comparação entre as médias, consideradas duas a duas.

Para a causa de variação "animais", o valor de  $\Delta$  foi 0,25, e as médias foram:

Animais - 6 - 2,70

7 - 3,22

8 - 3,21

Com base nestes valores, verifica-se que a média do animal de número 6 diferiu das médias dos animais de números 7 e 8, significativamente.

Para a causa de variação "tratamento", o valor de  $\Delta$  foi de 0,54 e as médias foram as seguintes:

Tratamentos:-  
 I - 2,83  
 II - 3,00  
 III - 3,02  
 IV - 3,08  
 V - 2,96  
 VI - 2,66  
 VII - 3,76

Neste caso se verifica que a média do tratamento VII diferiu significativamente de todas as outras correspondentes aos outros seis tratamentos.

Para a causa de variação "tempos", o valor de  $\Delta$  foi de - 0,25 e as médias foram as seguintes:

Tempos:- 60 min - 1,44  
 120 min - 2,88  
 180 min - 4,71

Pode-se verificar que neste caso todos os contrastes foram significativos.

Pela análise de variância (tabela XXIII), pode-se ainda verificar que houve significância para a interação "animais x tratamentos", cujo desdobramento está apresentado na tabela XXIV.

TABELA XXIV  
DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO "ANIMAIS X TRATAMENTOS"

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento dentro de animais :				
Animal 6 .....	6	3,8958	0,6493	4,99**
Animal 7 .....	6	11,0071	1,8345	14,11**
Animal 8 .....	6	3,4987	0,5831	4,48**

O teste de TUKEY (20) foi aplicado às médias do desdobramento da interação "animais x tratamentos", da forma como segue:

Tratamento dentro de animais:- o valor de  $\Delta$  foi de 0,90 e as médias estão apresentadas na tabela XXV.

TABELA XXV

MÉDIAS DE  $QO_2$  PARA TRATAMENTOS DENTRO DE ANIMAIS SEGUNDO O TRATAMENTO  
E O ANIMAL

ANIMAIS TRATAMENTOS			
	6	7	8
I	2,30	3,30	2,91
II	2,92	2,72	3,37
III	3,56	2,24	3,29
IV	2,46	3,85	2,93
V	2,88	2,85	3,14
VI	2,20	3,02	2,77
VII	2,61	4,59	4,08

Neste caso observou-se contrastes significativos entre as médias, distribuídos de modo desordenado, para os três animais da série.

\*

\*

\*

## 6 - DISCUSSÃO

### 6.1 - Generalidades

O tecido cerebral de suíno foi utilizado na pesquisa, devido ao fato desse animal reunir em si, uma série de possibilidades relacionadas com as condições materiais de técnica e experimentação. Ainda, foi o tecido que apresentou maior atividade em relação ao músculo esquelético (massêter) e polpa dental, segundo AYRES (1). Isto permitiu admitir maior sensibilidade do tecido nervoso (cérebro), em resposta às variações introduzidas no meio de suspensão, desde que a atividade respiratória mantém estreita relação com a atividade metabólica.

Também, pôde-se evidenciar dos estudos sobre metabolismo, que o tecido cerebral possui todas as atividades enzimáticas necessárias à manutenção das principais vias metabólicas encontradas em outros órgãos do corpo, o que se tem denominado "autonomia do metabolismo cerebral" (22).

Por imposição das condições materiais, as experimentações no respirômetro de Warburg estiveram restritas ao "método direto" (39).

As técnicas para obtenção das fatias de tecido, obedecidas neste trabalho, foram as mesmas descritas e empregadas por AYRES (1), porque atenderam às necessidades mínimas de segurança em experimentos respirométricos.

Cuidados especiais foram seguidos, no intuito de se assegurar estreitos limites nas variações das espessuras das fatias de tecido, obedecendo às especificações da fórmula de Warburg (39). Igualmente, relações constantes foram mantidas entre cargas de massa de tecido úmido e volumes nos frascos de Warburg. O tempo decorrido entre o sacrifício do animal e o início da respirometria foi sempre - que possível semelhante e ao redor de 90 minutos, fato que não criava condições de degeneração ponderável dos tecidos.

Quando da aplicação das variáveis (tratamentos), procurou-se sempre obedecer às condições fundamentais acima descritas, conferindo assim, maior segurança aos resultados.

Os tratamentos aplicados ao soro, objetivaram estabelecer condições que possibilitassem fracionamento qualitativo, tendo em vista obter frações de soro alteradas e especificamente ajustadas para

que os tecidos encontrassem diferentes condições físico-químicas nos meios de suspensão.

A aplicação ao sôro, de processos de diálise e precipitação relativa pelo aquecimento, criou condições de fracionamento, possibilitando o isolamento do "fator" alterador da respiração, segundo sua natureza: se proteínico (não dialisável, destruído pelo aquecimento) ou se não protéico (dialisável, resistente ao aquecimento), caso existisse sob uma ou mais formas.

Havendo ainda, a possibilidade de estar o "fator", localizado numa fração iônica do sôro, pesquisou-se a ação de cátions bivalentes, pela susceptibilidade de formação de quelatos com o verse-ne e fixação pelo oxalato ou pelo citrato.

Posteriormente à aplicação desses tratamentos, considerando-se os resultados já alcançados, bem como as observações de AYRES(1) os diferentes tratamentos foram diluídos com solução tampão Krebs - Ringer-fosfato (39), na proporção de 20% de sôro (alterado ou não) e 80% da solução tampão.

Objetivou-se com essa medida, melhorar as características do sôro, em relação aos fatores físico-químicos (capacidade de solvatação do oxigênio), que pudessem limitar a atividade respiratória do tecido.

Possibilidades de interferências nos resultados respirométricos, por atividade microbiana inexistiram conforme o comprovado por AYRES (1), pelo menos durante três horas iniciais da respirometria.

## 6.2 - SÉRIE A

### 6.2.1 - Animais

Segundo a análise de variância (Tabela XIX), verificou-se que houve variação entre animais. Ainda, pelo teste de Tukey pode-se observar que a variação entre animais distribuiu-se homogênea - entre os mesmos, ou seja, os animais diferiram regularmente entre si.

Embora tenha sido utilizado o mesmo tipo de tecido de animais da mesma espécie, estes foram escolhidos ao acaso, com idades e sexos diferentes e evidentemente com patrimônios hereditários também diferentes.

Assim, por imposição do planejamento estatístico, desenvol



veu-se o trabalho com amostras não estratificadas, tornando satisfatórias as conclusões indicadas pelo teste "F" (significância para a causa de variação "animais" - Tabela XIX).

Diante desse comportamento apresentado pelos animais, obtidos nas condições gerais apontadas, quase que se pôde aceitar integralmente a generalização do conceito segundo o qual, também animais de outras procedências, responderiam análogamente aos métodos experimentais aplicados, desde que variações entre animais são esperadas em experimentos biológicos dessa natureza.

### 6.2.2 - "Tratamentos"

Na análise de variância (Tabela XIX) observa-se que para a causa de variação "tratamentos", o teste "F" indicou significância. Por outro lado o teste de TUKEY evidenciou algumas significâncias para alguns tratamentos e não significâncias para outros.

Segundo o planejamento da pesquisa, procurou-se isolar um ou mais "tratamentos" (como causa de variação), que possibilitasse uma resposta satisfatória à indagação fundamental, qual seja, a explicação para a possível diferença de comportamento do tecido, quando - suspenso ou em sôro sanguíneo íntegro, ou, em sôro sanguíneo modificado.

#### 6.2.2.1 - Tratamentos I e II - Sôros homólogo e heterólogo

Estabeleceu-se o sôro homólogo como o padrão, contra o qual os resultados da aplicação dos demais tratamentos foram comparados, isto porque este tratamento foi o que criava condições mais próximas das naturais.

Assim sendo, deve-se compreender bem a potencialidade natural que esse meio de suspensão poderia representar para as fatias de tecido, conforme o verificado nas experiências respirométricas, tornando-se então, o índice através do qual se avaliariam as possíveis alterações provocadas pelos tratamentos subsequentes, aplicados ao sôro, dentro do planejamento da pesquisa.

Nas condições "in vivo", considerando-se o plasma sanguíneo, sabe-se que a provisão de oxigênio para as células dos tecidos ocorre quase que totalmente por conta da hemoglobina, através de um

18/456

mecanismo bem definido. Sabe-se ainda, que uma pequena fração da capacidade de transporte de oxigênio, pelo sangue, ocorre por simples dissolução física no plasma.

Quando se promove a suspensão de fatias de tecido em soro sanguíneo, o mecanismo da provisão de oxigênio se altera completamente, desde que há eliminação dos elementos figurados do sangue, bem como de seus constituintes normais, retidos no coágulo, estando o oxigênio apenas fisicamente dissolvido. Permanecem, porém, nos sôros (homólogo e heterólogo no caso), os componentes nutritivos indispensáveis ao metabolismo celular. Admitindo-se que ocorressem alterações, estas se deram em todas as amostras, com semelhantes intensidades, porém conservando certa padronização do soro, o que foi constatado pela permanência, sempre, das atividades respiratórias das fatias de tecido.

O novo mecanismo de provisão de oxigênio para as fatias de tecido foi caracterizado pela maior possibilidade de dissolução do oxigênio no soro em relação à solubilidade no plasma, permitida pelas alterações sofridas por este e facilitada pela agitação constante do material no interior dos frascos do respirômetro de Warburg.

Assim, em resumo, a intensidade do consumo de oxigênio, apresentada pelas fatias de tecido nervoso (córtex cerebral) e demonstrada pela respirometria, foi atingida mediante a atuação conjunta de: potencial nutritivo do soro, provisão de oxigênio e provável perda de auto-regulação metabólica presente "in vivo".

#### 6.2.2.2 - Tratamento III - Soro dialisado

A aplicação do processo analítico da diálise ao soro sanguíneo fundamentou-se na possibilidade de se localizar um fator influente na respiração das fatias de tecido, presente neste soro. Segundo sua natureza poderia ser passível de difundir-se para o meio contra o qual o soro sofreu dialisação (tampão fosfato 0,001 M, pH 7,40).

O controle da dialisação do soro foi feito através da verificação das variações dos volumes inicial e final (tabela XVI), bem como da avaliação de seu conteúdo em cálcio ionizado (Tabela XVII) e ainda pelas verificações das variações de pH (Tabela XVI).

Analisando-se os dados disponíveis para o controle da dialisação do soro sanguíneo, verificou-se que realmente houve trocas -

iônicas e translação de solvente durante o processo, desde que:

1) Os volumes iniciais de sôro sanguíneo submetidos à diálise, foram sempre de 50 ml, atingindo, após diálise, volumes superiores. (Tabela XVI).

2) A concentração de cálcio no sôro dialisado decresceu, indicando difusão: - de 11,00 mg% no sôro integral a 2,50 mg% no sôro dialisado (Tabela XVII).

3) Pequenas variações de pH foram observadas nos sôros submetidos à diálise (Tabela XVI).

Verificou-se ainda, que o pH do sôro sanguíneo dialisado, após a respirometria (Tabelas XIV e XV), apresentou sempre valor menor, em relação aos pH finais (após respirometria), apresentados pelos sôros submetidos a outros tratamentos. Isto deve ser consequência dos seguintes fatos:

a) Perda de eletrólitos durante a diálise e presumíveis componentes de sistemas tampões (sistemas carbonato, fosfato e citrato).

b) Maior possibilidade de dissolução do gás carbônico, por aumento da solvatação específica:



Embora houvesse, como já foi discutido, incidência de significância para a causa de variação "tratamentos" (Tabela XIX), o teste de TUKEY não possibilitou maiores evidências que merecessem discussões mais extensas, razões pelas quais foi lícito admitir que, a presença de cátions difusíveis, agindo como controladores da respiração do tecido "in vitro", parece não ter sido um fato positivo.

Poderia se admitir porém, que cátions controladores da respiração "in vitro" estivessem ligados às proteínas e portanto não difusíveis. Como sôro sanguíneo desproteínizado (vide Tratamento VII) não apresentou alterações nos experimentos respirométricos, esta última suposição também fica em grande parte anulada. Tudo parece estar no campo do poder de solvatação do oxigênio referente a cada meio de suspensão.

#### , 6.2.2.3 - Tratamentos IV, V e VI - Sôros modificados por adição de oxalato, citrato e EDTA

Segundo o planejamento da pesquisa, previu-se também na

série A, a possível influência de tratamentos modificadores do sôro como auxiliares para se detectar um agente influenciador da respiração das fatias de tecido, conforme fôsse sua natureza não proteínica porém iônica ou então, catiônica ligada à proteína.

Os íons de cálcio(juntamente com sódio, potássio e cloro), desempenham papel físico-químico fundamental no balanceamento iônico dos fluídos orgânicos. Em adequadas condições de equilíbrio eletrolítico é que ocorrem fenômenos fisiológicos normais, tais como, a excitabilidade muscular e o transporte através das membranas permeáveis etc., tudo representando trabalho executado e conseqüente consumo de energia.

A ação quelante de substâncias como o EDTA, o oxalato e o citrato influenciando às vèzes dràsticamente, sôbre a concentração do cálcio ionizado, como foi no caso do EDTA e do oxalato, no sôro sanguíneo foi mais uma vez comprovada pelos dados da tabela XVII.

Os teores de cálcio expostos na tabela XVII, evidenciaram a fato de os agentes modificadores do sôro sanguíneo, representando as bases físico-químicas dos trabalhos desenvolvidos, confirmarem o previsto: houve de fato quelação de íons divalentes.

Sabe-se que a promoção de variações na concentração de íons difusíveis determina alterações nas diferenças de potencial elétrico das membranas celulares, suporte para explicações de certos fenômenos bioelétricos.

Essas variações alteram também as relações de pressão osmótica entre o meio de suspensão e as células das fatias de tecido, envolvendo no fenômeno o efeito de Donnan, que se aplica aos sistemas biológicos, desde que membranas separam as diferentes substâncias em íons difusíveis e íons não difusíveis.

O metabolismo celular, atividade essencialmente dinâmica, altera a concentração dos componentes difusíveis e não difusíveis, deslocando o equilíbrio de Donnan. Dessa forma o efeito de Donnan se manifesta explicando o mecanismo da absorção e secreção de substâncias pelas células, mantendo as concentrações diferenciais entre o meio interno e o meio extra celular.

Outro aspecto de grande importância, diretamente relacionado com as modificações introduzidas no sôro sanguíneo, é o da solubilidade dos gases nos líquidos orgânicos.

Sabe-se que a solubilidade de um gás em solução varia com a presença e quantidade de sais e também de não eletrólitos, diminuindo

do à medida que aumenta a concentração do soluto total e que os líquidos orgânicos se caracterizam como soluções aquosas de vários sais. Ressalte-se que o volume de oxigênio dissolvido em 100 ml de água a 20°C é de 0,635 ml e o volume do mesmo gás dissolvido no mesmo volume de plasma a 37°C é de 0,338 ml (22), sendo, portanto, a temperatura, fator crítico. Daí, o cuidado experimental obedecido no referente à temperatura do banho do respirômetro de Warburg.

Com respeito ao problema da viscosidade, sabe-se que a do sôro sanguíneo é maior que a da água. A fração proteínica do sôro influe na manutenção de sua viscosidade. A diluição do sôro com água reduz sua viscosidade (22).

Sôbre o aspecto específico das variações de tensão superficial provocadas no sôro sanguíneo com os tratamentos modificadores, cabe destacar o fato da mesma tornar-se mais elevada com a desproteínização do sôro, o que deve intervir no processo de solvatação do oxigênio. Mas, outros fatores agem paralelamente com as proteínas na manutenção de uma tensão superficial inferior à da água, típica do sôro sanguíneo. São êles: presença de colóides hidrófilos, ácido tânico, sais biliares, lecitina, amido e glicogênio (22). Uma baixa intensidade de variação na tensão superficial do sôro sanguíneo, quando de sua desproteínização, deve ser observada devido a êsse fato.

Verifica-se então, que a ação conjunta dos fatores físico-químicos (pressão osmótica, solubilidade do oxigênio, viscosidade e tensão superficial), compõe um estado que caracteriza a intensidade de solvatação do oxigênio no sôro sanguíneo. Desta forma, a promoção de alterações nos constituintes séricos atinge os fatores descritos, levando a modificações na intensidade de solvatação do oxigênio no sôro.

Diante de todos os aspectos discutidos, se justificou a programação da pesquisa, incluindo as variações nas concentrações iônicas do sôro, no sentido de se verificar a possibilidade de localização numa de suas frações, de um agente alterador do comportamento metabólico das fatias de tecido, evidenciado pelo índice respirométrico.

As verificações analisadas estatisticamente resultaram na impossibilidade de se evidenciar um tratamento onde se pudesse firmar posição definitiva para esclarecer o problema em estudo, dentro desta fase dos trabalhos.

6.2.2.4 - Tratamento VII - Soro desproteínizado por precipitação pelo calor

O soro desproteínizado não mostrou um comportamento diferente dos demais sôros modificados, bem como em relação ao soro integral.

Em condições normais, ou seja "in vivo", a provisão de oxigênio é realizada quase que totalmente pela hemoglobina. Apenas uma pequena fração da capacidade total de transporte do oxigênio pelo sangue se faz por dissolução física no plasma.

Esse mecanismo de transporte do oxigênio para os tecidos - está ausente "in vitro", o que modifica completamente a condição físico-química do oxigênio disponível às fatias de tecido.

Sabe-se que a tiroxina estimula o consumo de oxigênio: aproximadamente 40% do consumo de oxigênio utilizado para a produção de calor e para atender ao metabolismo oxidativo, são resultantes da atividade reguladora do hormônio da tireóide (6 e 27).

Dessa forma o soro desproteínizado deveria apresentar alterações no consumo de oxigênio, devido à ausência do constituinte proteínico hormonal, o que não ocorreu, pois não foi detectada alteração alguma.

Parece razoável que a agitação do material durante a respirometria aliada à ausência de partículas em suspensão (células), confira para a manutenção da intensidade de consumo de oxigênio apresentado pelo soro integral.

Mas, a desproteínização total (e conseqüente eliminação de hormônios classificados como proteínas), levaria a um estado de menor estimulação metabólica das fatias de tecido. Este aspecto depressor poderia ser compensado pela maior quantidade de oxigênio dissolvido no soro sanguíneo desproteínizado (maior capacidade de solvatação do oxigênio), fato concreto, em vista dos resultados respirométricos.

Assim sendo, nos tratamentos III, IV, V, VI e VII, embora ocorressem tôdas as situações apontadas, influenciando no estabelecimento das condições de trabalho, elas não se manifestaram suficientemente intensas para esclarecer o problema em estudo, razão pela qual se esquematizaram os trabalhos da série B.

### 6.2.3 - Tempos

Pode-se observar pela análise de variância (Tabela XIX), - que o teste "F" foi significativo para a causa de variação "tempos".

A aplicação do teste de TUKEY mostra que as significâncias estão distribuídas de modo regular, pelos três intervalos de tempo - levados em consideração na análise estatística. Isto evidencia uma atividade continuada conforme a hora de determinação dos valores de  $QO_2$  tenha sido aos 60, 120 ou 180 minutos, respectivamente.

Considerando os dados estatísticos no sentido biológico - dos fatos analisados, pode-se entendê-los como demonstradores de um fenômeno contínuo, o que é lógico e esperado em respirometria, onde os dados representam uma somatória contínua das taxas de consumo de oxigênio. Esse aspecto é perfeitamente comprovado pelos traçados das curvas de  $QO_2$  (Figuras 1 a 5). Neles se observa as variações de intensidade do fenômeno representado, em função do tempo, mas nunca refletem deflexões drásticas que pudessem demonstrar perda de atividade das fatias de tecido, levando à admissão de que, pelo menos até três horas de respirometria, não ocorreu degeneração ponderável dos tecidos.

### 6.3 - SÉRIE B

Diante dos fatos até aqui discutidos, ficou aceita a impossibilidade de se admitir, especificamente, um agente indutor químico no sôro sanguíneo, controlador da atividade respiratória das fatias de tecido, suspensas nesse meio biológico.

Em vista dos resultados alcançados na série A, foi planejada a série B, segundo esquema experimental específico.

O fato do não aparecimento de diferenças significantes entre os tratamentos, pelo menos no sentido de se poder responsabilizar um ou mais deles, pela significância do teste de "F" (Tabela XIX Série A), permite a suposição de que o fator investigado estivesse - protegido, de modo a suportar os efeitos dos tratamentos então aplicados.

No trabalho de AYRES (1), encontram-se sólidas bases para o estabelecimento das condições introduzidas na série B, quais sejam os resultados apresentados pelo autor, evidenciando diferenças - bastante sensíveis entre o comportamento das fatias de tecido, sus-

pensas em sôro animal e em solução tampão Krebs-Ringer-fostato (39).

Pode-se afirmar que a especulação científica permitida pela série A se justifica, desde que, pelas observações de AYRES (1), não se poderia planejar a série B, sem antes tentar responder à questão imposta pela lógica: estaria numa das frações do sôro sanguíneo o fator indutor das diferenças detectadas pelo citado autor?

Somente depois de uma verificação nesse sentido, poder-se-ia voltar a atenção para estudos envolvendo uma composição onde participassem o sôro sanguíneo e sôro artificial, como foi estabelecido na série B.

Na série B foram então, adotadas novas condições experimentais. Nesta série houve diluição do sôro animal (modificado ou não), em sistema tampão Krebs-Ringer-fosfato (39), na proporção de 20% do sôro para 80% da solução (volume a volume), condição esta estabelecida com base nos resultados da própria série A e nos trabalhos de AYRES (1) e KREBS (25).

Os resultados alcançados e analisados estatisticamente, na série B, levaram às seguintes observações:

a) As alterações impostas ao meio de suspensão da série B não modificaram o comportamento da causa de variação entendida como "animais", da série A (Tabelas XIX e XXIII).

b) Em relação à causa de variação "tratamentos", ainda se observou estarem presentes na série B, os aspectos discutidos na série A, em relação aos tratamentos I, II, III, IV, V e VI, desde que não se detectou entre eles uma diferença de resultados ou efeitos significativos, dentro da análise estatística.

Em relação ao tratamento VII da série B (sôro desproteínizado pelo calor e diluído em tampão Krebs-Ringer-fosfato) (39), as fatias de tecido apresentaram maior consumo de oxigênio, durante o tempo de observação respirométrica (Teste de TUKEY), mostrando visíveis diferenças no comportamento.

Sendo o tratamento VII uma solução com menor número de partículas, devido à desproteínização e diluição, permitiu maior possibilidade de solvatação do oxigênio, o que permitiu aceitar as condições físicas do meio de suspensão, como fator efetivamente interferente na respiração das fatias de tecido.

O mesmo aspecto foi também observado por ELLIOT e HENRY (14): segundo esses autores, o consumo de oxigênio pelas células (atividade respiratória), pode ser limitado pela difusão do gás da fa-



se gasosa para a líquida, superando mesmo os próprios controles endógenos dos tecidos e principalmente quando a agitação do sistema é pequena e grande é a atividade biológica. Sabe-se ainda, segundo WINZLER (41), que o aumento da agitação, por si só, não representa uma indicação real da difusão adequada do oxigênio.

Ainda segundo observações complementares, verificou-se (tabela XVIII) que a uma atmosfera de 100% de oxigênio, o tecido não respirou em maior intensidade, se comparado ao mesmo tecido que respirou em atmosfera de 50% de oxigênio, o que confirmou a observação de ELLIOT e HENRY (14), segundo a qual, a atmosfera de 100% de oxigênio exerce até mesmo ação inibitória de fatias de tecido nervoso (cérebro).

Os resultados apresentados na tabela XVIII mostraram que à baixa tensão de oxigênio na atmosfera diminuem os índices respiratórios. Sobre esse aspecto ELLIOT e HENRY (14) observaram que o fato ocorreu independentemente da limitação da difusão do oxigênio.

Diante dos fatos analisados, verificou-se que as células das fatias de tecido submetidas a maiores pressões parciais de oxigênio, no meio de suspensão (dentro de limites fisiológicos), puderam utilizá-lo em maior intensidade.

...Inferências podem então ser estabelecidas:

1) A auto-regulação celular não foi prejudicada pelas alterações químicas do meio de suspensão, de tal modo a permitir respostas respiratórias constantes, ou,

2) As alterações químicas introduzidas no meio de suspensão não sensibilizaram os mecanismos de auto-regulação metabólica celular.

3) Então, as alterações físico-químicas que modificaram as condições de solvatação dos meios de suspensão, sendo efetivas em provocar respostas diferentes, deveram, ou agir diretamente sobre os mecanismos de auto-regulação, ou então superar a eficiência dos mesmos.

Resumindo, o fator maior, evidenciado por este trabalho, e que condicionou a utilização do oxigênio por fatias de tecido, foi a pressão parcial de oxigênio no meio de suspensão, diretamente relacionada com a intensidade de solvatação do oxigênio no meio de suspensão.

c) Para a causa de variação "tempos", também são válidas -

as considerações já elaboradas na série A, desde que os resultados - da série B (Tabela XXIII) indicaram o mesmo comportamento verificado na série anterior, o que era esperado uma vez que as anotações respirométricas eram continuamente crescentes, a menos que houvesse paralisação da atividade respiratória.

\*

\*

\*

## 7 - CONCLUSÕES

Considerados os limites experimentais do trabalho, concluiu-se que:

a) as variações nas atividades respiratórias das fatias de tecido nervoso (córtex cerebral), foram causadas exclusivamente por alterações introduzidas no meio de suspensão e diretamente relacionadas ao problema físico da solvatação do oxigênio.

b) A eliminação de cálcio sérico ionizado (ação de agentes quelantes: EDTA, citrato e oxalato), não influenciou na atividade respiratória de fatias de tecido nervoso (córtex cerebral) de suíno, sus pensas nesse meio.

c) A desproteinização total do soro sanguíneo, utilizado - como meio de suspensão para fatias de tecido nervoso (córtex cerebral) não alterou a atividade respiratória dessas fatias.

d) A eliminação de íons através diálise, do soro sanguíneo utilizado como meio de suspensão, não alterou a atividade respiratória das fatias de tecido nervoso (córtex cerebral) de suíno.

e) As conclusões anteriores são válidas mesmo quando variações individuais, inerentes ao tipo de amostragem utilizada, se fizeram notar.

f) Não houve, durante o transcorrer de todos os experimentos, alterações parceráveis na atividade das amostras de tecido utilizadas, indicando ausência de degeneração dentro dos limites de tempo impostos pelos métodos experimentais.

\*

\*

\*

B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AYRES, G.C.M. - Determinação do consumo de oxigênio  $QO_2$  e  $QO_2^{(N)}$  em masséter, cérebro e polpa dental de suíno - "*Sus scrofa domestica*, Gray - Influência do meio de suspensão, do teor de oxigênio da atmosfera e de tetraciclina, sobre a respiração "in vitro". Faculdade de Farmácia e Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 1965. Tese de Livre-Docência.
- 2 - BACILA, M. & FARIA, A.M. - Guia de trabalhos práticos de bioquímica e patologia geral. Diretório Acadêmico de Agronomia e Veterinária do Paraná, Curitiba, 1ª Edição, 1956, p. 91.
- 3 - Idem, Ibidem, p. 116.
- 4 - Idem, Ibidem, p. 137.
- 5 - BERQUIÓ, ELZA - Bioestatística, Universidade de São Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública, São Paulo, 1967.
- 6 - CANTAROW, A. & SCHEPARTZ, B. - Biochemistry, 3th Ed., W.B. Saunders, Philadelphia, London, 1962, 938 p.
- 7 - CANZANELLI, A., GREENBLATT, M., ROGERS, G.A. & RAPPORT, D. - The effect of pH changes on the "in vitro" oxygen consumption. Am.J.Physiol., 127: 290 5, 1939.
- 8 - D'ARCANGELO, P. & MARCHETTI, M. - Oxygen consumption of rat brain homogenates treated with streptomycin and dehidestreptomycin. Atti.Accad.Nazl.Lincei Rend., Classesci.Fis.Mat. e Nat., 25: 590-4, 1958. In: Chem.Abstr., 54: 23019e, 1958.
- 9 - DASZYNSKA, F., KRYNSKY, A. & NYREK, S. - Ceruloplasmin and copper in the serum of the pigs. Med.Weter., 22 (6): 363-66, 1966. In: Chem.Abstr., 48 (12): 58810, 1967.
- 10 - DIXON, T.F. & MEYER, A. - Respiration of the brain. Biochem.J., 30: 1577, 1936.

- 11 - DIXON, W.J. & MASSEY, J.F.J. - Introduction to statistical analysis, 2Th. McGraw-Hill, Book Co., New York, 1957.
- 12 - DRAHOTA, Z., HAHN, P., MOUREK, J. & TROJANOVA, M. - The effect of acetoacetate on oxygen consumption of brain slices from infant and adult rats. Physiol.Boemoslev, 14 (2):134-6, 1965. In: Chem.abstr., 63 (1): 1025d, 1965.
- 13 - DUCET, G. - Diffusion of oxygen in vegetable tissues. Proc. Western Europe Conf. Photosyn., 2nd, Zeist, Neth. 449-52, 1965. In: Chem.Abstr., 65 (13): 20387a, 1966.
- 14 - ELLIOT, K.A.C. & HENRY, M. - Metabolism of brain suspensions III. Respiration at low oxygen tension. J.Biol.Chem., 163 (1): 351-60, 1946.
- 15 - EUGENIA, G., ABABEI, L. & STEFAN, M. - Influence of pH on respiration and glycolysis in rat brain slices. Fisiol.Norm.Patol., 12 (5): 449-52, 1966. In: Chem.Abstr., 66 (25): 113-793s, 1967.
- 16 - FIELD, J. et alii - Effect of temperature on the oxygen consumption of brain tissue. J.Neurophysiol., 7:117-26, 1944. In: Chem.Abstr., 38: 2717, 1944.
- 17 - FRIEDEL, W. & KLICHE, N. - Effect of EDTA on fat metabolism. Deut.Gesundheitsw, 23 (27): 1264-7, 1968. In: ChemAbstr., 69 (25): 10490x, 1968.
- 18 - FUHRMAN, F.A. & FIED, J. - The use of low environmental temperature during the preparation of tissue slices for respiration "in vitro". J.Biol.Chem., 153: 515-20, 1944.
- 19 - GALLAGHER, C.H., JUDAH, J.D. & RESS, K.R. - Glucose oxydation by brain mitochondria. Biochem.J., 62 (3): 436-40, 1956.
- 20 - GEIGER, J.M., TAYLOR, R.M. & VERALLI, M. - Effect of blood constituents on uptake of glucose and metabolic rate of the brain in perfusion experiments. Am.J.Physiol., 177: 138-49 1954.

- 21 - GOMES, F.P. - Curso de estatística experimental - 3ª ed., Grafica Benetti, Piracicaba, 1966.
- 22 - HARPER, H.A. - Manual de química fisiológica, Atheneu, São Paulo, 1968, 534 p. Trad. de Sylvio Bevilacqua.
- 23 - HIMWICH, H.E. & NAHUM, L.H. - The respiratory quotient of the brain. Am.J.Physiol., 101: 446-53, 1932. In: Chem.Abstr., - 26: 5632, 1932.
- 24-- KAORU, I. & ARIMATSU, Y. - Metabolic responses of brain cortex slices in calcium deficient medium in vitro. Sci.Pap.Coll. Gen.Educ.Univ.Tokyo, 18 (2): 231-9, 1968. In: Chem.Abstr., 71 (3): 10990c, 1969.
- 25 - KREBS, H.A. - Body size and tissue respiration. Biochem. et Bioph. Acta, 4: 249-69, 1950.
- 26 - KOZAWA, S. & NAITO, K. - The effect of sodium, potassium and calcium on metabolism of rat cerebral cortical slice with or without electrical stimulation. Jap.J.Pharmacol., 16 (4): 451-77, 1966.
- 27 - LANGLEY, L.L., CHERASKIN, E. & SLEEPER, R. - Dynamic Anatomy and Physiology. McGraw-Hill Book, New York, 1958, 719 p.
- 28 - MATSUMOTO, YASUHISA - Tissue respiration of cerebrum of rabbit "in vitro". Influence of physiological ions and glucose. - Kumamoto Med.J., 5 (1): 44-53, 1952. In: Chem.Abstr., 48: 4078d, 1952.
- 29 - MATSUMOTO, Y., NISHIMURA, S., SAITO, N. & KURAUCHI, Y. - Influence of oxygen tension and phosphate on tissue respiration. Acta Med.Univ.Kagoshima, 10 (2): 197-202, 1968. In: Chem.Abstr., 70 (17): 75684c, 1969.
- 30 - MENDELSON, J.H., WARMOTH, M. & MENDELSON, J. - Effect of magnesium on metabolism of isolated cerebral tissue. Bol. Int. Estud.Med.Biol., 22(2):231-40, 1964. In: Chem.Abstr., 62 (5): 5756f, 1965.

- 31 - PAUL, J. - Cell and tissue culture - 2Th Ed., Living-Stone, -  
Edinburg and London, 1961, 312 p.
- 32 - QUASTEL, J.H. & WHEATLEY, A.H.M. - Oxydations by the brain. -  
Biochem.J., 26: 725-44, 1932.
- 33 - RODGERS, S.H., FENN, W.O. & CRAIG, A.B.Jr. - Oxygen consumption  
of rat tissues in the presence of nitrogen, helium, or hy-  
drogen. Resp.Physiol., 6 (2): 168-77, 1969. In: Chem.Abstr.  
71 (7): 28391r, 1969.
- 34 - SAVDOV, M. - Calcium and phosphorus fractions in the serum of  
pigs. I. Content in healthy piglets and pigs. Vet.Med.Nau-  
ki, 5 (5): 83-8, 1968. In: Chem.Abstr., 70 (9): 35809t, -  
1969.
- 35 - SKOLNIK, J., TAKACS, L. & SZEND, E. - In vitro oxygen consump-  
tion of slices from Kdney, brain cortex, and liver in hi-  
poxia (rat). Nature, 209 (5020): 305, 1966.
- 36 - TAKAGAKI, G., HIRANO, S. & TSUKADA, Y. - Effects of some inhibi-  
tions on the metabolism of guinea pig brain slices. -  
Biochem.J., 54: 41-48, 1958.
- 37 - TAKAGAKI, G. - Control of aerobic glycolysis and pyruvate kina-  
se actyvtiy in cerebral cortex slices. J.Neurochem., 15  
(9): 903-16, 1968.
- 38 - THANGAMANI, A. - Cerebral tissue respiration; effects of aceta-  
zolamide and calcium ions. Biochem.Pharmac., 14 (1): 89-90  
1965. In: Chem.Abstr., 62 (13): 16798a, 1965.
- 39 - UMBRIET, W.W., BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F. - Manometric Te-  
chinqiques and Tissue Metabolism. 2nd Ed. Burgess Publishing  
Mineapolis, 1951, 227 p.
- 40 - VRBA, R. & FOLBERG, J. - Endogenous metabolism in brain cortex  
slices. Nature, 182 (4.630): 237-8, 1958.

- 41 - WINZLER, R.J. - Cell and Comp.Physiol., 17: 63, 1941. Apud -  
ELLIOT, K.A.C. & HENRY, M., 1946.
- 42 - WORTIS, J. - The effect of serum on survival tissue of brain -  
tissue and a revival of cerebral oxidation. Archs. Neurol.  
Psychiat., 51: 176-8, 1944. In: Chem.Abstr., 38: 4664, -  
1944.

\*

\*

\*



9 - A P Ê N D I C E

TABELA XXVI

RESPIROMETRIA EM WARBURG - CONSUMO DE OXIGÊNIO (EM MICROLITROS), POR  
 TECIDO CEREBRAL SUSPENSO EM TAMPOÃO KREBS-RINGER-FOSFATO pH 7,40, SOB  
 DIFERENTES ATMOSFERAS DE OXIGÊNIO (ANIMAL Nº 9)

$\% \text{ DE OXIGÊNIO}$ TEMPOS EM MINUTOS	20	35	50	65	85	100
15	61	69	112	65	67	70
30	112	124	161	103	114	113
45	171	194	218	180	168	170
60	225	254	269	232	217	215
75	287	323	311	286	269	260
90	346	387	363	340	320	299
105	423	471	428	407	375	353
120	513	547	470	466	437	406
135	588	598	509	500	475	460
150	629	633	531	520	500	495
165	672	673	557	556	531	523
180	707	699	577	578	555	546

TABELA XXVII

MASSAS SECAS DO TECIDO CEREBRAL COLOCADAS EM WARBURG EM RELAÇÃO ÀS  
 DIFERENTES ATMOSFERAS DE OXIGÊNIO (ANIMAL Nº 9)

$\% \text{ DE OXIGÊNIO}$ MASSAS SECAS	20	35	50	65	85	100
mg	70,80	69,95	45,50	48,85	47,00	42,50

TABELA XXVIIIANIMAL Nº 1 = SÉRIE A

RESPIROMETRIA EM WARBURG - CONSUMO DE OXIGÊNIO (EM MICROLITROS) POR  
TECIDO CEREBRAL, SOB OS TRATAMENTOS APLICADOS

TRATAMENTOS TEMPO EM MINUTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII
10	24	22	25	19	24	19	17
20	53	54	55	48	53	49	48
30	82	85	85	70	81	76	77
40	105	111	109	93	118	100	102
50	135	140	114	118	134	130	133
60	170	180	176	149	164	163	164
70	198	210	201	182	200	194	197
80	218	228	219	197	215	210	216
90	230	251	237	214	236	233	238
100	262	276	255	233	259	258	260
110	290	305	279	262	282	285	285
120	308	322	291	282	301	305	301
130	329	286	318	294	322	321	325
140	342	286	345	313	344	319	349
150	374	309	359	346	366	366	375
160	401	338	382	359	386	389	401
170	426	361	407	381	412	413	425
180	446	383	421	403	436	436	448

TABELA XXIXANIMAL Nº 2 - SÉRIE A

RESPIROMETRIA EM WARBURG - CONSUMO DE OXIGÊNIO (EM MICROLITROS) POR  
POR TECIDO CEREBRAL, SOB OS TRATAMENTOS APLICADOS

TRATAMENTOS TEMPO EM MINUTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII
15	43	54	80	52	48	43	57
30	112	95	99	88	84	79	92
45	164	135	146	125	120	110	134
60	220	181	199	168	165	133	187
75	259	215	238	202	198	162	219
90	306	253	278	238	236	191	260
105	338	280	308	265	268	217	290
120	382	317	349	294	289	243	323
135	420	351	379	329	322	266	357
150	462	388	420	363	357	297	395
165	507	427	460	399	399	332	434
180	546	463	499	436	432	362	478

TABELA XXX  
ANIMAL Nº 3 - SÉRIE A

RESPIROMETRIA EM WARBURG - CONSUMO DE OXIGÊNIO (EM MICROLITROS), POR  
TECIDO CEREBRAL, SOB OS TRATAMENTOS APLICADOS

TRATAMENTOS TEMPO EM MINUTOS							
	I	II	III	IV	V	VI	VII
15	50	50	55	78	69	60	73
30	105	106	114	156	137	122	101
45	167	173	173	238	211	195	240
60	220	229	226	303	376	251	310
75	270	293	285	387	344	319	406
90	327	345	326	447	400	373	479
105	380	408	376	506	462	433	553
120	424	459	425	558	515	488	629
135	476	533	469	621	578	549	715
150	526	588	522	684	639	604	795
165	574	644	568	743	696	665	886
180	605	660	606	762	743	703	949

TABELA XXXI  
ANIMAL Nº 4 - SÉRIE A

RESPIROMETRIA EM WARBURG - CONSUMO DE OXIGÊNIO (EM MICROLITROS), POR  
TECIDO CEREBRAL, SOB OS TRATAMENTOS APLICADOS

TRATAMENTOS TEMPO EM MINUTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII
15	24	22	19	41	28	37	39
30	71	74	59	90	75	106	111
45	99	107	85	110	105	152	157
60	136	148	113	129	123	210	218
75	179	195	145	150	188	270	277
90	211	237	176	167	232	332	341
105	237	266	198	180	260	375	386
120	267	289	205	185	279	402	414
135	287	321	224	199	312	445	458
150	322	359	247	216	350	491	505
165	360	398	268	234	387	541	561
180	397	429	285	251	471	584	607

TABELA XXXII  
ANIMAL Nº 5 - SÉRIE A

RESPIROMETRIA EM WARBURG - CONSUMO DE OXIGÊNIO (EM MICROLITROS), POR  
TECIDO CEREBRAL, SOB OS TRATAMENTOS APLICADOS

TRATAMENTOS TEMPO EM MINUTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII
15	38	25	24	26	32	31	38
30	94	71	37	78	91	84	96
45	144	113	54	117	138	128	146
60	199	162	69	155	200	184	208
75	248	202	84	211	252	235	257
90	284	227	96	241	293	288	298
105	335	366	107	285	344	317	349
120	388	311	117	335	398	370	402
135	436	352	129	382	449	418	453
150	483	396	139	475	493	464	496
165	524	476	150	457	535	503	540
180	571	462	161	499	583	546	590

TABELA XXXIII  
ANIMAL Nº 6 - SÉRIE B

RESPIROMETRIA EM WARBURG - CONSUMO DE OXIGÊNIO (EM MICROLITROS), POR  
TECIDO CEREBRAL, SOB OS TRATAMENTOS APLICADOS

TRATAMENTOS TEMPOS EM MINUTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII
15	19	26	24	29	133	36	38
30	60	75	65	75	147	96	94
45	98	117	146	120	175	148	146
60	118	138	164	139	199	174	175
75	153	183	201	181	235	226	226
90	195	232	243	231	284	288	288
105	232	278	282	279	326	348	346
120	272	326	320	326	369	414	407
135	314	373	363	375	415	475	467
150	348	415	394	418	455	530	527
165	387	460	426	478	499	599	592
180	421	501	467	521	540	664	655



TABELA XXXIV  
ANIMAL Nº 7 = SÉRIE B

RESPIROMETRIA EM WARBURG - CONSUMO DE OXIGÊNIO (EM MICROLITROS), POR  
TECIDO CEREBRAL, SOB OS TRATAMENTOS APLICADOS

TRATAMENTOS TEMPOS EM MINUTOS							
	I	II	III	IV	V	VI	VII
15	33	29	28	33	33	43	39
30	79	67	51	89	77	87	84
45	114	103	96	133	121	134	132
60	154	139	130	174	163	179	180
75	193	171	166	222	205	226	226
90	220	198	193	253	236	263	264
105	257	236	224	307	277	312	326
120	300	277	257	303	323	370	369
135	340	313	288	425	377	432	475
150	377	348	318	488	403	495	478
165	396	365	335	562	425	530	509
180	428	399	366	617	469	595	569

TABELA XXV  
ANIMAL Nº 8 - SÉRIE B

RESPIROMETRIA EM WARBURG - CONSUMO DE OXIGÊNIO (EM MICROLITROS), POR  
TECIDO CEREBRAL, SOB OS TRATAMENTOS APLICADOS

TEMPOS EM MINUTOS	TRATAMENTOS						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
15	32	22	21	21	29	31	22
30	75	60	53	55	66	74	90
45	121	105	92	93	106	113	147
60	167	144	123	132	146	144	205
75	212	190	158	173	181	192	261
90	238	215	182	203	210	227	308
105	283	260	218	244	254	276	370
120	320	299	245	278	288	322	431
135	356	340	272	318	327	370	486
150	404	393	310	371	375	430	557
165	439	435	338	416	410	460	623
180	477	481	469	465	448	531	696